

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1978 - N° 150

THÈSE

présentée à l'Université Claude Bernard - Faculté de Pharmacie
et soutenue publiquement le 7 Juin 1978
pour obtenir le grade de Docteur d'Etat es Sciences Pharmaceutiques
par

GEAHCHAN Aziz
né le 6 Juin 1952
à BEYROUTH (Liban)

Contribution au dosage du SELENIUM
et de ses métabolites dans divers milieux
(liquides biologiques, eaux, aliments)

JURY

M. CHAMBON Paul
M. VALLON Jean-Jacques
M. PROST Guy
M. DAUDON Marc
M^{me} CAILLARD Liliane

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I

FACULTÉ DE PHARMACIE

Lyon 1988

THÈSE

présentée à l'Université Claude Bernard - Faculté de Pharmacie
et soutenue publiquement le 7 Juin 1988
pour obtenir le grade de Docteur en Sciences Pharmaceutiques

CHAUCHON Anne

et de 2 Jours 1988

2-1274/1988 (Lyon)

Contribution au dosage de SELBNITAM
et de ses métabolites dans divers milieux
(liquides biologiques, eaux, aliments)

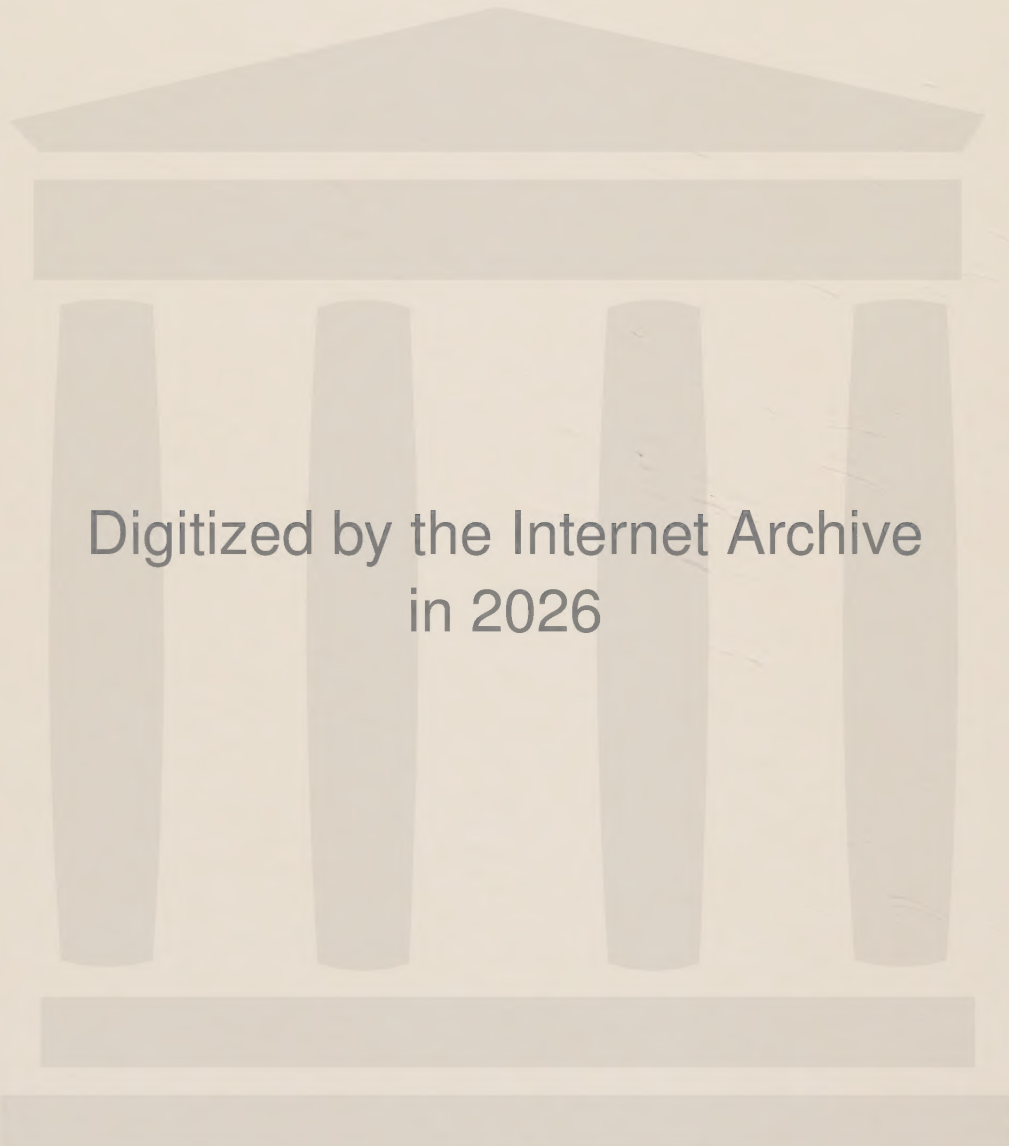
JURY

M. CHAMON Paul

M. FALLON Jean-Jacques

M. FROST Guy

M. LAFONT Michel



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554224_0001

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1978 - N°

THÈSE

présentée à l'Université Claude Bernard - Faculté de Pharmacie
et soutenue publiquement le 7 Juin 1978
pour obtenir le grade de Docteur d'Etat es Sciences Pharmaceutiques

par

GEAHCHAN Aziz

né le 6 Juin 1952

à BEYROUTH (Liban)

Contribution au dosage du SELENIUM
et de ses métabolites dans divers milieux
(liquides biologiques, eaux, aliments)

JURY

M. CHAMBON Paul

M. VALLON Jean-Jacques

M. PROST Guy

M. DAUDON Marc

M^{me} CAILLARD Liliane

FACULTE DE PHARMACIE

Année 1977 - 78

THÈSE

présentée à l'Université Claude Bernard - Faculté de Pharmacie
et soumise publiquement le 7 Juin 1978
pour obtenir le grade de Docteur d'Etat en Sciences Pharmaceutiques

par

GEAUCHAN Aziz

né le 6 Juin 1952

à BEYROUTH (Liban)



Contribution au dosage du SELÉNIOUM
et de ses métabolites dans divers milieux
(liquides biologiques, eaux, aliments)

JURY

M. CHAUBON Paul
M. VALLON Jean-Jacques
M. FROST Guy
M. DARDON Marc
M^{me} CAILLARD Edmée

PRESIDENT : M. LE PROFESSEUR D. GERMAIN

PREMIER VICE-PRESIDENT : M. LE PROFESSEUR ELBAZ

DEUXIEME VICE-PRESIDENT : M. P. PONCET, MAÎTRE-ASSISTANT

TROISIEME VICE-PRESIDENT : M. C. BADOR, ETUDIANT

SECRETAIRE GENERAL DE L'UNIVERSITE : M. J. RAMBAUD, ADMINISTRATEUR CIVIL

DIRECTEURS DES U.E.R. ET DOYENS DES FACULTES :

FACULTE DE MEDECINE GRANGE-BLANCHE : MONSIEUR BERNARD SALLE, M.C.A.

FACULTE DE MEDECINE ALEXIS-CARREL : MONSIEUR LE PR RENÉ MORNEX

U.E.R. DE MEDECINE LYON-NORD : MONSIEUR JEAN PIERRE NEIDHART, M.C.A.

FACULTE DE MEDECINE SUD-OUEST : MONSIEUR LE PR JEAN NORMAND

FACULTE DE PHARMACIE : MONSIEUR LE PR CHARLES-ALBERT BIZOLLON

U.E.R. DE TECHNIQUES DE READAPTATION : MONSIEUR ALAIN MORGON, M.C.A.

U.E.R. DE BIOLOGIE HUMAINE : MONSIEUR JEAN PIERRE REVILLARD, M.C.A.

U.E.R. I.R.E.P.S. : MONSIEUR ALBERT MILLON, PROFESSEUR D'E.P.S.

U.E.R. DE SCIENCES ODONTOLOGIQUES : MONSIEUR LE DR ROGER VINCENT

U.E.R. DE MATHEMATIQUES : MONSIEUR LE PR EDMOND COMBET

U.E.R. DE PHYSIQUE : MONSIEUR LE PR JEAN DELMAU

U.E.R. DE CHIMIE-BIOLOGIE : MONSIEUR LE PR JEAN HUET

U.E.R. DE SCIENCES DE LA NATURE : MONSIEUR LE PR RENÉ GINET

U.E.R. DE SCIENCES PHYSIOLOGIQUES : MADEMOISELLE LE PR JEANNE-FRANÇOISE WORBE

U.E.R. DE PHYSIQUE-NUCLEAIRE : MONSIEUR LE PR MARK GUSAKOW

I.U.T. N° 1 : MONSIEUR LE PR BERNARD POUYET

I.U.T. N° 2 : MONSIEUR J. GALLET, DIRECTEUR E.N.S.A.M.

OBSERVATOIRE DE LYON : MONSIEUR GUY MONNET, ASTRONOME ADJOINT

U.E.R. DE MECANIQUE : MADEMOISELLE LE PR GENEVIÈVE COMTE-BELLOT

T R A V A I L

du Laboratoire de Toxicologie et d'Hygiène
Industrielle de l'UNITE d'ENSEIGNEMENT et
de RECHERCHE des SCIENCES PHARMACEUTIQUES
de LYON ,

du Service des Eaux de l'INSTITUT PASTEUR
de LYON .

A MES PARENTS

A TOUS MES AMIS

A TOUS CEUX qui ont contribué à la réalisation
de ce travail.

Qu'ils trouvent ici le témoignage
de ma reconnaissance et de ma profonde
affection.

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. CHAMBON

Il est impossible dans quelques lignes de remerciements de s'acquitter de la dette contractée envers son professeur pour l'activité intense qu'il a déployée pour nous, les connaissances profondes, les qualités humaines, la générosité, la bonté et l'amitié, qu'il a constamment mises à notre disposition durant trois années.

Il nous a confié ce sujet de recherche et a accepté d'assumer la responsabilité de la direction de cette thèse. Qu'il nous soit permis de lui exprimer notre gratitude pour la bienveillance avec laquelle il nous a accordé son aide lors de ce travail, ainsi que pour l'enseignement spécialisé de toxicologie dont il nous a fait bénéficier.

Qu'il veuille trouver ici le témoignage de notre respectueux attachement et de notre profonde reconnaissance.

AUX MEMBRES DE NOTRE JURY :

MONSIEUR LE PROFESSEUR J.J. VALLON

dont l'enseignement nous fut précieux.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de nos respectueux remerciements et notre profonde reconnaissance.

MONSIEUR LE PROFESSEUR G. PROST

qui a bien voulu juger ce travail.

Nous lui exprimons nos respectueux remerciements.

MONSIEUR LE PROFESSEUR M. DAUDON

Pour notre travail, nous avons largement bénéficié de ses précieux conseils.

Nous le prions de bien vouloir trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

MADAME L. CAILLARD, Docteur en Pharmacie,
Attachée à la direction des recherches
biologiques à Rhône-Poulenc

Nous la remercions de l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant très aimablement d'être parmi nos Juges.

Nous tenons à l'assurer de notre profonde reconnaissance.

A MADAME CHAMBON, Maître-Assistant au Laboratoire
de Toxicologie de la Faculté de Pharmacie de Lyon

Nous la remercions de l'attention
qu'elle nous a portée et de l'aide qu'elle
nous a accordée au cours de notre travail,
et pour l'enseignement dont elle nous a
fait bénéficier auparavant.

Qu'elle trouve dans ce travail l'expres-
sion de notre profonde reconnaissance et de
notre haute considération.

A TOUS LES MEMBRES du Laboratoire de Toxicologie
et du Laboratoire de Chimie organique de la Faculté
de Pharmacie de Lyon

En amical souvenir des années passées
au Laboratoire et en remerciement de leur
aide.

A MADEMOISELLE SCHWARTZ pour l'aide qu'elle nous a
apportée en assurant avec rapidité tout le travail
de secrétariat.

P L A N

	<u>Pages</u>
INTRODUCTION.....	1
TRAVAUX ANTERIEURS.....	3
1. Préparation et propriétés physico-chimiques du sélénium.....	4
2. Le sélénium et l'environnement.....	8
3. Le sélénium et les microorganismes.....	16
4. Le sélénium et les plantes.....	20
5. Métabolisme.....	30
6. Applications.....	58
7. Toxicologie du sélénium et de ses dérivés..	62
8. Traitement.....	95
9. Rôle nutritionnel du sélénium.....	100
10. Interactions.....	126
11. Revue des principales méthodes d'analyse quantitative du sélénium.....	134
TRAVAUX PERSONNELS.....	165
1. Dosage spectrophotométrique dans le visible. Revue de quelques méthodes d'analyse du sélénium.....	166
2. Recherche d'une méthode de minéralisation...	194
3. Dosage spectrofluorimétrique.....	220
4. Protocole utilisé.....	284
5. Applications.....	286
CONCLUSION.....	305
BIBLIOGRAPHIE.....	306

I N T R O D U C T I O N

Par suite à plusieurs demandes d'analyse du sélénium dans les urines de sujets supposés intoxiqués, nous avons été amenés à étudier la toxicologie de cet élément.

Nous consacrons la première partie de notre thèse à l'étude du sélénium sous les différents aspects suivants : propriétés physico-chimiques, présence dans la nature, pharmacologie, toxicité, activité nutritionnelle, applications et traitement des intoxications. Cette étude est suivie par une revue générale des méthodes analytiques. Comme nous allons le voir, les données publiées à ce sujet en France demeurent très rares et la toxicologie professionnelle semble être très peu connue. Toute intervention lors d'une exposition, qu'elle soit accidentelle, thérapeutique ou professionnelle, exige une connaissance profonde de ces différentes propriétés et nécessite la mise au point d'une méthode de dosage rapide, efficace et reproductible, afin de suivre l'évolution de l'intoxication.

Plusieurs méthodes d'analyse ont été décrites, la plupart s'appliquent aux matières biologiques et aux plantes. Celles utilisées pour le dosage du sélénium dans les urines sont longues, laborieuses et compliquées, elles nécessitent une prise d'essai importante et donnent lieu à un rendement médiocre.

Au cours de ce travail, une méthode fiable a été étudiée, mais afin de conclure à une exposition ou à une intoxication au sélénium, il a fallu déterminer les teneurs normales en cet élément chez la population saine. Les données publiées à ce sujet sont là aussi très rares, et les seules valeurs que nous possédons sont celles qui ont été observées

aux Etats-Unis il y a une vingtaine d'années, et en Angleterre entre les années 1956 et 1958. En France, aucune étude n'a été réalisée dans ce domaine, et aucune valeur moyenne ne peut être retenue. Mais la constitution du sol français, sa faible teneur en sélénium, et l'abondance du syndrome myopathie - dyspnée des veaux de lait, suggèrent des teneurs encore plus faibles. La détermination de doses aussi faibles rencontre de sérieuses difficultés en raison de la volatilité de ce métalloïde et de l'extrême variabilité de ses états en fonction du potentiel d'oxydo-réduction et des conditions opératoires. Une étude détaillée dans ce domaine a été réalisée.

La méthode sera appliquée aussi au dosage du sélénium dans les eaux. Des teneurs faibles seront observées et viendront confirmer les résultats d'analyse des urines.

T R A V A U X A N T E R I E U R S

1. PREPARATION ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

DU SELENIUM ET DE SES DERIVES

1.1. LE SELENIUM ELEMENTAIRE -

a) PREPARATION :

L'intérêt du sélénium s'est considérablement accru ces dernières années, en raison de quelques-unes de ses applications : cellules photo-électriques et redresseurs de courant.

La préparation se fait par :

- 1) Extraction à partir de l'acide sulfurique.
- 2) Extraction à partir des boues de chambres de plomb, par voie humide ou par voie sèche.
- 3) Extraction à partir des suies et des dépôts de chambres à poussière (fours à graphite - fours à soufre).
- 4) Extraction à partir des minerais.
- 5) Extraction à partir des boues d'affinage électrolytique du cuivre.

b) PROPRIETES PHYSIQUES :

Le sélénium, de numéro atomique 34, appartient au groupe VI b et possède, de ce fait, des propriétés métalliques et non métalliques. Différentes variétés allotropiques ont été décrites, on distingue actuellement :

- le sélénium vitreux ou le "sélénium noir" qui est sa forme commerciale courante ;
- le sélénium rouge ou amorphe (appelé encore gamma-sélénium) ;
- le sélénium rouge monoclinique ;
- le sélénium gris ou métallique conducteur et photo-conducteur ;
- et le sélénium colloïdal.

Les principales caractéristiques sont les suivantes :

	Sélénium vitreux	Sélénium amorphe	Sélénium cristallisé	Sélénium gris
Forme cristalline	-	-	mono-clinique	hexagonale
Densité...	4,3	4,3	4,45	4,80
Conductibilité électrique	nulle	nulle	nulle	semi-conducteur et photo-conducteur
Solubilité dans CS ₂ ..	-	-	soluble	-
Point de fusion.	-	-	170-180°C	220°C

c) PROPRIETES CHIMIQUES :

Le sélénium présente deux propriétés principales :

- 1) Action réductrice : il est oxydé par l'eau oxygénée et l'acide nitrique fumant en acide sélénique. Il réduit les persulfates, les chlorates et les bromates.
- 2) Action catalytique : il catalyse :
 - l'hydrogénation du charbon en industrie ;
 - l'oxydation du gaz sulfureux et l'attaque sulfurique des composés organiques.

1.2. L'ACIDE SELENHYDRIQUE H₂Se -

a) PREPARATION :

L'hydrogène sélénié est obtenu par :

- hydrogénation du sélénium et des séléniures ;
- hydrolyse des séléniures.

b) PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES :

Sa densité est de 0,0036 à 1 atmosphère. Il se solidifie à -65,7°C à l'état liquide et bout à -41,2°C.

L'introduction de 4 moles % de ce gaz à l'hydrogène en recule la limite de l'inflammabilité à 12 %. Son addition au mélange propane-air fait décroître la vitesse de propagation de la flamme.

1.3. LES SELENIURES Se^{--}

Les sélénures alcalins sont incolores et très solubles dans l'eau. Sous l'action de l'air, ils se décomposent en abandonnant du sélénium rouge.

1.4. L'ANHYDRIDE SELENIEUX SeO_2

a) ETAT NATUREL ET PREPARATION :

Il existe à l'état naturel sous forme de sélénolite. La préparation industrielle s'effectue à l'air en présence de catalyseur à base d'oxydes de chrome ou de manganèse.

b) PROPRIETES PHYSIQUES :

Il se présente sous la forme de masses cristallines blanches ou d'aiguilles translucides. Il fond à 340°C en tube scellé et se sublime à 315°C .

Il est soluble dans l'eau.

c) PROPRIETES CHIMIQUES :

Il se comporte comme un oxydant dans un certain nombre de réactions chimiques : il oxyde le bore, le phosphore, le soufre, ...

Il est réduit par l'hyposulfite de sodium en monoxyde de sélénium et réagit avec le thiosulfate de sodium en formant le séléno-pentathionate de sodium, de formule $\text{Na}_2\text{SeS}_4\text{O}_6$.

En présence d'eau, il donne de l'acide sélénieux.

1.5. L'ACIDE SELENIEUX H_2SeO_3

a) PREPARATION :

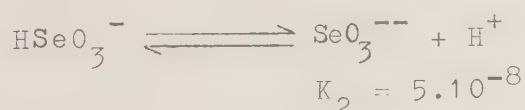
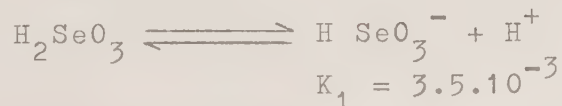
Il se forme lors de l'oxydation, par l'iode, du sélénium.

b) PROPRIETES PHYSIQUES :

Il se présente sous la forme de prismes, de densité 3,00. Il est très soluble dans l'eau.

c) PROPRIETES CHIMIQUES :

C'est un acide faible. Il se dissocie dans l'eau suivant les réactions :



- Oxydation : sous l'action des oxydants, il est oxydé en acide sélénique. Le chlore et le brome l'oxydent dans l'eau. Il en est de même pour l'ozone, l'eau oxygénée et le permanganate.
- Réduction : il est réduit en sélénium par le thiosulfate de sodium et les acides phosphoreux et hypophosphoreux. Sa réduction par l'hydrazine en sélénium colloïdal est possible. Cette réaction est à la base d'un dosage spectrophotométrique.

1.6. L'ACIDE SELENIQUE H_2SeO_4

a) PREPARATION :

Il est obtenu à partir de l'acide sélénieux par oxydation.

b) PROPRIETES PHYSIQUES :

Il se présente sous la forme d'une masse cristalline fondant à $58^{\circ}C$, mais restant facilement en surfusion. Il est déliquescent.

c) PROPRIETES CHIMIQUES :

- Fonction acide : l'acide sélénique est un diacide dont la première acidité est aussi forte que celle de l'acide sulfurique.
- Pouvoir oxydant : c'est un oxydant vis-à-vis du soufre, du phosphore, de l'arsenic, de l'acide chlorhydrique, de l'acide iodhydrique et du bromure de potassium.

1.7. L'OXYCHLORURE DE SELENIUM $SeOCl_2$

a) PROPRIETES PHYSIQUES :

C'est un liquide fumant à température ordinaire, parfois jaunâtre, mais incolore quand il est pur. Il bout sous la pression normale à $179,5^{\circ}C$.

b) PROPRIETES CHIMIQUES :

Il attaque les métaux avec formation de chlorures métalliques.

Il attaque le caoutchouc à chaud. Il dissout les gommes, les résines, les laques, certains protides, les cheveux et le cuir.

2. LE SELENIUM ET L'ENVIRONNEMENT

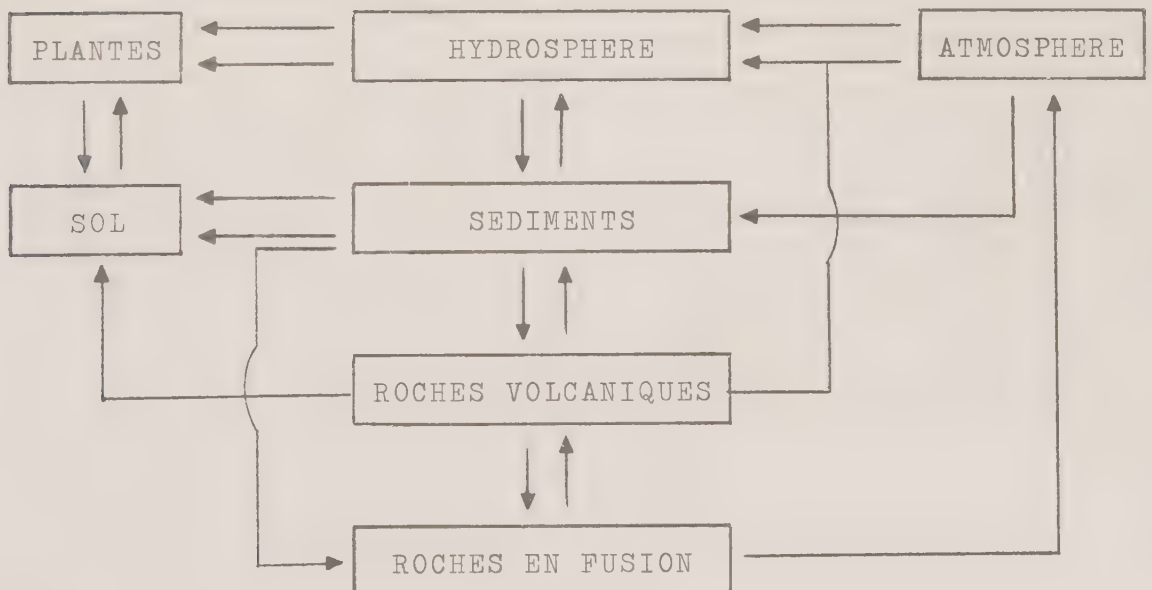
2.1. ORIGINE - FACTEURS GEOLOGIQUES INTERVENANT DANS SA REPARTITION -

Le sélénium est l'un des rares éléments qui se trouvent répandus en faibles quantités dans presque tous les matériaux de l'écorce terrestre. Ses concentrations maximales ne dépasseraient guère 500 ppm.

Cette répartition dans les sols est régie par un certain nombre de facteurs qui sont les suivants :

- a) sa présence ou non dans les constituants-mères de l'écorce terrestre ;
- b) sa concentration peut diminuer à la suite de phénomènes d'érosion, ou augmenter à la suite d'un apport d'origine météorique ou souterraine (eaux souterraines, éruptions volcaniques) ;
- c) les processus de réarrangement et de formation de la croûte terrestre jouent aussi un rôle prédominant et fondamental.

Le cycle géochimique du sélénium a été décrit par LAKIN H.W. et DAVIDSON D.F. (218). On peut le représenter par le schéma simplifié suivant :

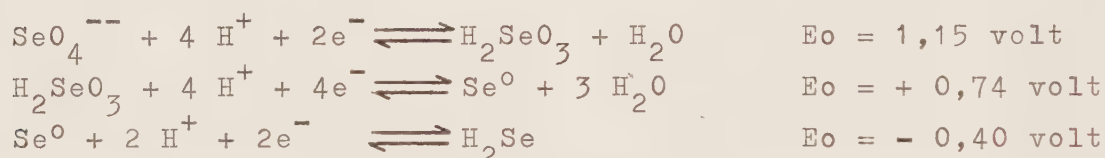


2.2. RELATIONS ENTRE LE POTENTIEL D'OXYDO-REDUCTION, LA VALENCE ET LA PRESENCE DU SELENIUM DANS LE SOL -

Pour mieux comprendre la répartition du sélénium dans l'environnement, les différentes formes sous lesquelles il se trouve et leur solubilité, ainsi que les liaisons avec d'autres éléments, il est nécessaire de connaître la variation du potentiel d'oxydo-réduction des différents états d'oxydation du sélénium en fonction du pH, donc du milieu où ils se trouvent.

Le premier diagramme d'oxydo-réduction en fonction du pH a été réalisé par KRAUSKOPF (214) en 1955. Les valeurs sont données pour des concentrations en ions de 10^{-7} moles par litre, ce qui représente approximativement 8 μ g de sélénium par litre.

Les principales réactions d'oxydo-réduction sont les suivantes :



Selon KRAUSKOPF, seules les trois formes SeO_3^{--} , SeO_4^{--} et Se^0 , sont des formes stables. Les sélénites ont tendance à s'oxyder en présence de l'eau de surface ayant dissous de l'oxygène. L'exemple le plus typique est celui des mines d'uranium du plateau du Colorado : lors de l'oxydation de la pyrite par l'eau présente dans le sol, l'hydrogène sélénié est mis en liberté pour être oxydé ensuite à l'état de sélénium rouge élémentaire.

Le sélénium est aussi facilement oxydé de l'état élémentaire Se^0 à l'état Se^{4+} (SeO_3^{--}). Les sélénites sont stables en milieux acide et alcalin léger. Ainsi, il est très fréquent de trouver des sélénites en nature. Ces derniers, en solution très diluée et en présence de chlorure ferrique, donnent un précipité très insoluble : sélénite basique ferrique, de formule $\text{Fe}_2(\text{OH})_4\text{SeO}_3$. Cependant, le rapport sélénium/fer n'est pas toujours constant. La formation de ce précipité permet d'expliquer la teneur élevée en sélénium du sol de certaines régions du Hawaï malgré un taux pluvial important.

Les sélénites, instables, peuvent s'oxyder facilement en sélénites qui subissent à leur tour une réduction ultérieure. On retrouve ce phénomène dans les minerais d'uranium de la région de Carbon County et de Wyoming aux U.S.A.

Dans des conditions favorables, les sélénites peuvent s'oxyder en séléniates. En milieu fortement acide, c'est à dire pour une concentration en H^+ d'une mole par litre, le potentiel d'oxydo-réduction $SeO_3^{--} - SeO_4^{--}$ est de -1,15 volt. Par suite, l'oxydation des sélénites en séléniates ne pourra être réalisée que par l'intermédiaire d'oxydants très puissants. Mais, pour des pH voisins de 7 et supérieurs, la différence entre les deux potentiels d'oxydo-réduction du $SeO_3^{--} - SeO_4^{--}$ et $H_2O - O_2$ est alors de 0,4 volt, différence largement suffisante pour permettre une oxydation quantitative. Ceci explique la présence du sélénium à l'état de séléniate dans les sols alcalins et humides.

2.3. TENEURS EN SELENIUM DU SOL ET DIFFERENTES FORMES EXISTANT -

Le contenu de la plupart des sols en sélénium semble varier entre 0,1 et 0,2 ppm. Cependant, en 1959, VINOGRADOV (427) trouva une teneur moyenne dix fois plus faible.

Le sol de la Nouvelle-Zélande est l'un des moins riches en sélénium : $< 0,1$ ppm, alors que des teneurs de 1.200 ppm sont retrouvées dans les sols riches en matières organiques en Irlande.

Des valeurs allant jusqu'à 4 ppm ont été mentionnées en Nouvelle-Zélande, sans qu'il s'agisse cependant de concentration toxique ; une région étant dite toxique lorsque le sol fournit une végétation riche en sélénium dont les teneurs dépassent les valeurs admissibles (voir chapitre : Toxicologie du sélénium et de ses dérivés).

2.3.1. - Les séléniates :

Dans les sols alcalins et bien aérés, les différentes formes chimiques du sélénium passent, à la suite de leur oxydation, à l'état de séléniates. Ces derniers restent à l'état libre, ne forment ni des sels insolubles avec les cations présents dans les sols alcalins, ni des complexes d'adsorption, et ne coprécipitent pas avec des sesquioxydes.

La cinétique de la réaction de réduction des sélénates en sélénites est lente, ce qui explique leur stabilité.

2.3.2. - Les sélénites :

Ils donnent des complexes stables avec les oxydes de fer hydratés dans les sols acides (218). La solubilité négligeable de ces complexes permet d'expliquer l'absorption modérée du sélénium par les plantes accumulatrices dans les

sols acides et ferrugineux riches en cet élément et, par suite, la faible teneur en sélénium de ces plantes.

Selon WILLIAMS et BYERS (447), il s'agit d'une sélénite ferrique basique, de formule $\text{Fe}(\text{OH})_4\text{SeO}_3$. Mais les travaux les plus récents ont montré qu'il s'agit soit d'un complexe d'adsorption, soit d'un coprécipité d'hydroxyde ferrique $\text{Fe}(\text{OH})_3$ et de sélénite HSeO_3^- .

Les ions sélénites existant dans le complexe $\text{Fe}(\text{OH})_3 - \text{SeO}_3\text{H}^-$ voient leur solubilité augmenter légèrement avec le pH lorsque celui-ci passe de 4 à 8. A pH = 8, le complexe $\text{Fe}(\text{OH})_3 - \text{SeO}_3\text{H}$ se décompose et la solubilité des ions SeO_3H^- augmente rapidement à partir de cette valeur de pH. Cet accroissement est expliqué par une compétition entre les ions OH^- et les ions SeO_3H^- vis-à-vis des sites actifs d'adsorption, entraînant une diminution de la stabilité du complexe en question et favorisant l'oxydation des ions sélénites en séléniates.

2.3.3. - Le sélénium élémentaire :

Dans l'eau aérée, le sélénium élémentaire est instable, mais cependant son oxydation est lente et la présence d'oxydants forts est nécessaire pour obtenir une oxydation rapide. Une partie de cette oxydation est d'origine biologique puisqu'elle est inhibée par le toluène.

A l'état élémentaire, le sélénium serait difficilement absorbé par les plantes.

2.3.4. - Les séléniures :

Ce sont les principaux constituants des pyrites et des minerais de soufre. La faible solubilité de certains séléniures métalliques, par exemple, le séléniure de cuivre, explique leur persistance dans les sols cultivés.

2.4. LE SELENIUM ET LES EAUX -

2.4.1. - Les eaux de mer :

Les données les plus complètes sont celles qui ont été fournies par SCHUTZ et TUREKIAN en 1965 (358). Ces auteurs estiment, pour le sélénium dans les eaux de mer, une teneur moyenne de 0,09 $\mu\text{g/litre}$. Ils ont étudié les variations de la concentration en fonction de la profondeur, mais leurs observations n'ont pas abouti à des résultats cohérents.

2.4.2. - Les eaux de surface et de profondeur :

Le sélénium est considéré comme étant l'un des constituants mineurs de l'eau potable, dont la teneur peut varier entre 0,1 et 100 µg/litre.

En 1947, DESALAS (92) a rapporté les teneurs en sélénium de 22 eaux superficielles dans différentes régions de l'Argentine. Les teneurs variaient entre 2 et 19 µg/litre avec une valeur moyenne de 3 µg/litre.

Aux U.S.A., sur 535 analyses réalisées entre le 1^{er} octobre 1958 et le 30 septembre 1961 par "l'U.S. Department of Health, Education and Welfare", seuls 2 échantillons ont présenté des teneurs supérieures à la limite de détection qui était de 10 µg/litre (218).

En France, MORETTE et DIVIN (269), en 1965, ont trouvé des teneurs allant de 5 à 75 µg/litre en sélénium, dans 24 échantillons provenant des eaux de surface.

En Suède, une teneur moyenne de 0,11 µg/litre a été trouvée dans 8 eaux différentes, d'origine superficielle ou profonde. La teneur la plus faible était de 0,06 µg/litre et a été trouvée dans l'eau de robinet à Stockholm, tandis qu'une teneur maximale de 0,15 µg/litre appartenait à l'eau de puits d'une région rurale (239).

La présence et la mobilité du sélénium dans les eaux de surface sont fonction directe du pH de ces eaux et des matériaux qui s'y trouvent en contact. Ces observations sont en accord avec les conclusions qu'on peut tirer du diagramme potentiel d'oxydo-réduction - pH. Dans les eaux fortement acides où l'ion ferrique ne subit pas une hydrolyse alcaline, les ions sélénites sont mobiles, mais lorsque le pH dépasse la valeur de 3,5, les ions sélénites précipitent avec l'hydroxyde ferrique formé. Dans les eaux alcalines et aérées, le sélénite est oxydé à l'état de séléniat et devient mobile.

En 1961, SCOTT et VOGELI (369) ont étudié la solubilité et la teneur en sélénium dans les eaux alcalines, et ceci sur 42 échantillons provenant d'eaux superficielles de la région du Colorado aux U.S.A. 9 avaient un pH compris entre 7,9 et 8,2, dont 8 présentaient une teneur allant de 20 à 400 µg/litre.

En 1962, l'U.S. Department of Health a limité la teneur maximale admissible en sélénium dans l'eau potable à 10 µg/litre.

2.5. LE SELENIUM ET LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE -

2.5.1. - Les sources :

- EMANATIONS VOLCANIQUES :

GOLDSCHMIDT (136) estime que ces émanations ont apporté 0,1 g de sélénium par cm^2 de surface.

- MINERAIS DE CHARBON ET PETROLE :

La présence du sélénium dans le charbon, la houille et le pétrole, a une importance considérable, vu l'effet nuisible que peut entraîner sur le système écologique le rejet dans l'atmosphère de produits hautement sélénifères.

Lors de la combustion, le sélénium passe dans l'atmosphère pour être redistribué de nouveau à la surface de la terre. Il existe peu de données sur les teneurs des différents minerais de charbon en sélénium. Une étude au Japon, faite sur deux minerais différents, a conduit à des résultats très voisins : 1,05 et 1,3 ppm respectivement. Aux U.S.A., les teneurs en sélénium de 86 échantillons provenant de 55 régions différentes, dans une vingtaine d'états américains, variaient de 0,46 à 10,05 ppm avec une valeur moyenne de 3,3 ppm (PILLAY - 315).

En ce qui concerne le pétrole, HASHIMOTO, HWANG et YANAGISAWA (167), ont trouvé une teneur de 0,82 ppm dans le pétrole brut consommé à TOKYO. PILLAY (315) a rapporté une valeur moyenne de 0,17 ppm dans 42 échantillons de pétrole brut américain.

- AUTRES SOURCES :

Les plantes hautement sélénifères présentent une odeur d'ail désagréable à la suite du dégagement de dérivés séléniés volatils, et la quantité qui passe dans l'air est en équilibre avec la teneur en sélénium de ces plantes. On trouve du diméthyl-disélénium et surtout du diméthyl-sélénium, constituant majeur de l'*Astragalus racemosus* (110). Ce même dérivé peut être synthétisé par certains micro-organismes et éliminé aussi bien par l'homme que par les animaux exposés à des teneurs élevées en sélénium, ou se nourrissant de produits enrichis en sélénium.

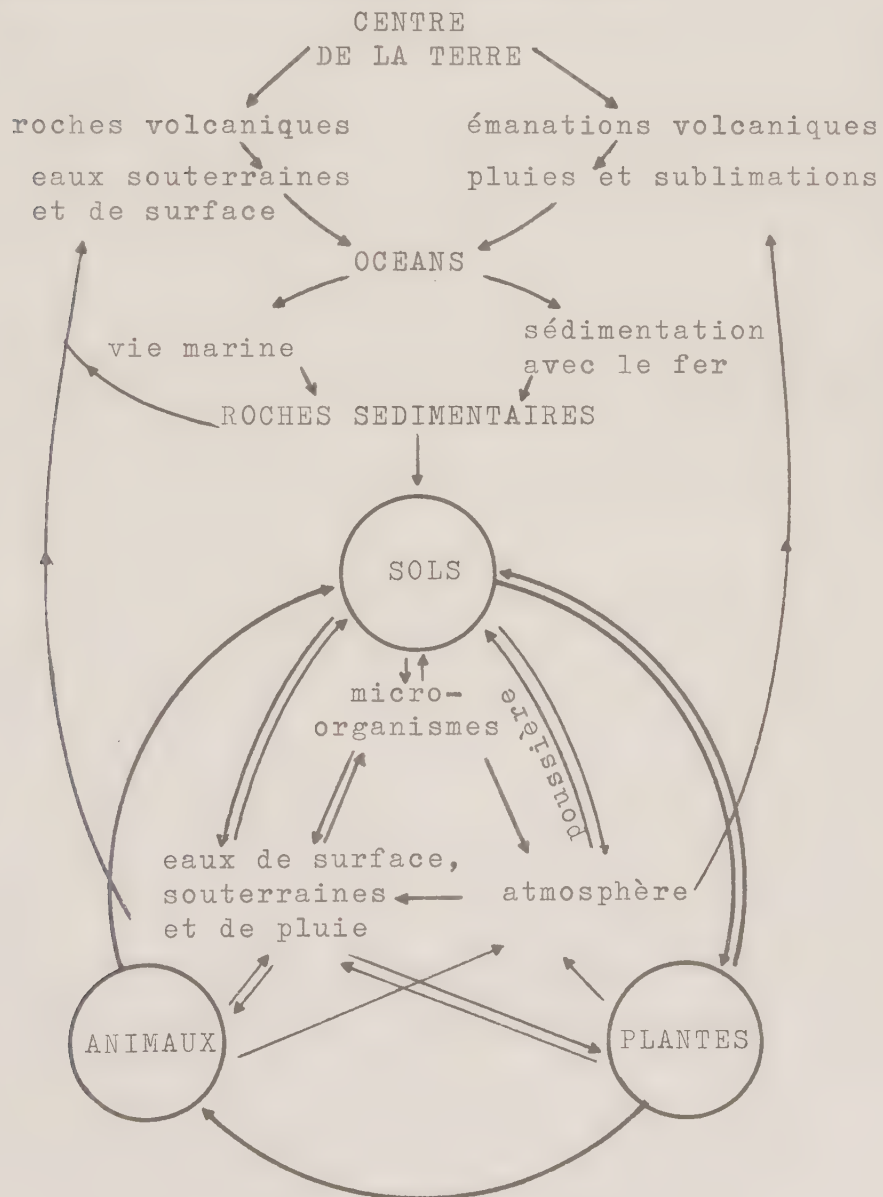
2.5.2. - Les données :

LAKIN et BYERS (217) ont trouvé des teneurs de 0,05 à 1 ppm dans la poussière atmosphérique retenue sur les filtres des appareils de climatisation, dans une dizaine de villes américaines. Des études plus récentes, utilisant la technique par activation neutronique, ont permis de déterminer les teneurs en sélénium dans la neige et la glace de la région

de Boston. Ces mesures ont révélé que la teneur en sélénium de la glace de cette région industrielle était 10 à 20 fois supérieure à celle retrouvée dans les glaciers du Greenland. Cette variation de la teneur en fonction de la distance était en nette corrélation avec l'activité industrielle, la nature et la dimension des particules que laissent échapper les cheminées des usines installées dans cette zone.

Dans la région industrielle de Cambridge, HASHIMOTO et WINCHESTER (168) ont trouvé, en 1965, une teneur moyenne de $0,09 \mu\text{g}/100 \text{ m}^3$ d'air. La concentration variait avec la nature et la quantité de combustible utilisé.

2.6. LE CYCLE DU SELENIUM DANS LA NATURE -



Cycle du sélénium dans la nature d'après OLSON O.E. : soil, plant, animal cycling of excessive levels of selenium, in O.H. MUTH (Edit.), symposium : Selenium in Biomedicine. Avi. publ. Comp. Westport, Connecticut, p. 297-312, 1967.

Le sélénium subit une bioconcentration à travers la chaîne écologique. Alors que sa concentration dans les eaux de mer ne dépasse pas 0,1 µg/litre, la valeur moyenne retrouvée chez les poissons, et en particulier le thon, est de 2 ppm. Une corrélation étroite a été décrite entre le mercure et le sélénium.

2.7. LES TENEURS EN SELENIUM DES ALIMENTS -

Les fruits de mer, la viande, le lait et les produits laitiers, les graines et les céréales, contiennent la majeure partie des sources du sélénium, tandis que les fruits et les légumes en contiennent peu ou pas du tout.

Voici quelques valeurs rapportées par SCHROEDER :

Fruits.....	0,006 ppm
Végétaux.....	0,010 ppm
Viandes.....	0,224 ppm
Farines, céréales.....	0,387 ppm
Fruits de mer.....	0,532 ppm
Aliments infantiles.....	0,068 ppm

La prise normale quotidienne est de 62 µg. A ce taux, on considère que le sélénium est le moins abondant et le plus toxique des éléments considérés comme étant essentiels chez les mammifères.

3. LE SELENIUM ET LES MICRO-ORGANISMES

3.1. ASPECT PHYSIOLOGIQUE -

3.1.1. - Antagonisme :

3.1.1.1. Analogues soufrés :

Dès 1934, lors de ses travaux sur le blé, HURD-KARRER (186) a réussi à mettre en évidence un antagonisme compétitif entre les ions sélénates et les ions sulfates dans le blé. Il a été suivi par FELS et CHELDELIN (114) en 1949, qui ont retrouvé le même mécanisme dans les levures, puis par POSTGATE en 1952, SHRIFT en 1954, WEISSMAN et TRELEASE en 1955 et WIDSTROM en 1961 (440, 446) chez d'autres micro-organismes. Cet antagonisme a lieu entre, d'une part, les ions sélénates et, d'autre part, certains composés soufrés tels que la méthionine, la cystéine et la thiamine. La liste ne s'arrête pas là puisque, au fur et à mesure que certains dérivés sélénés ont été découverts, leurs analogues soufrés se comportaient vis-à-vis d'eux comme de vrais antagonistes.

Ce type d'antagonisme semble être facile à expliquer. Il est dû à une compétition entre les deux éléments et leurs dérivés ou leurs métabolites au niveau des sites actifs des enzymes impliqués dans le métabolisme du soufre. Ceci a été démontré par un grand nombre d'expérimentations. Certaines exceptions demeurent et seront discutées ultérieurement.

3.1.1.2. Dérivés non soufrés :

D'autres substances semblent avoir un effet antagoniste vis-à-vis du sélénium. Il s'agit des dérivés de l'arsenic (BONHORST - 35), des phosphates (112) et de l'histidine. Le mécanisme d'action n'a pas encore été élucidé.

3.1.2. - Effet potentiel :

A l'opposé de l'antagonisme, il existe des interactions entre les ions sélénites et certains dérivés entraînant un renforcement de la toxicité. Ainsi, l'addition de sulfites et de nitrites augmente la toxicité des sélénites chez *Salmonella typhosa* (227). NORTH et BARTHRAM, en 1953 (287), ont noté le même effet pour les phosphates chez *Salmonella typhimurium*, et SCALA et WILLIAMS (351, 352) pour la L-méthionine et la L-homocystéine chez *Escherichia coli*. Ils en ont conclu qu'une augmentation de la concentration des acides aminés dans le milieu réduit, d'une manière évidente, la conversion cellulaire des sélénites en dérivés antimétabolites renfermant du sélénium (acides séléno-aminés). Par suite, la teneur intracellulaire en sélénium va augmenter. Il en est de même pour sa toxicité régie par son pouvoir oxydant.

3.1.3. - Autres effets :

Certains composants du milieu de croissance non engagés directement dans le métabolisme du soufre peuvent influencer la toxicité du sélénium (1, 353). SCALA et son équipe ont observé que le lactose, qui est une source principale de carbone, modifie la toxicité des sélénites chez *Escherichia coli*. Un certain délai a été observé avant l'apparition de ces symptômes et correspond à la période nécessaire d'adaptation, caractérisée par la synthèse de la bêta-galactosidase. Ceci n'a pas été observé avec les succinates.

3.1.4. - Tolérance et adaptation :

3.1.4.1. Tolérance :

Certains micro-organismes ont été isolés à partir de milieux enrichis en sélénium. BRENNER, en 1916 (39), avait déjà isolé deux sortes de bactéries ; à l'une d'elles, il a donné le nom de *Micrococcus selenicus*. Elle se développe en colonies rouges poussant indifféremment dans les milieux hautement séléniés et en présence de colorants tels que le bleu de méthylène, ou du sulfite de sodium Na_2SeO_3 .

Cette tolérance a été aussi décrite chez certaines *Salmonella* par LEIFSON en 1936.

3.1.4.2. Adaptation :

A côté de cette tolérance, existe le phénomène d'adaptation. Il existe deux sortes d'adaptation :

- les cellules continuent à se développer à la suite d'addition du sélénium. La croissance est cependant lente ;
- le développement cesse à la suite de l'addition du sélénium pour reprendre après une période plus ou moins longue. Il y a apparition d'espèces résistantes qui se développent à une vitesse normale.

Cette adaptation a lieu chez un grand nombre de micro-organismes : bactéries, champignons et algues. Elle a lieu en particulier chez certaines bactéries vivant en symbiose. On doit tenir compte de ceci lorsque certaines maladies telles que la maladie dégénérative d'origine nutritionnelle et d'autres maladies de carence en sélénium sont traitées par des dérivés séléniés, qu'il s'agisse d'une administration directe aux animaux ou à la suite d'application aux sols et/ou aux plantes.

3.1.5. - Modifications morphologiques :

Les dérivés séléniés peuvent entraîner :

- soit une modification de la croissance cellulaire ;
- soit une inhibition du mécanisme de division cellulaire, sans toucher cependant à la croissance.

3.1.6. - Rôle d'oligo-élément :

En 1954, PINSENT (317) a démontré que l'induction de la synthèse de la formiate déshydrogénase chez *Escherichia coli* nécessite la présence d'ions sélénites dans le milieu. La même observation a été réalisée par LESTER et DEMOSS en 1971 (230).

SHUM et MURPHY (389), utilisant du sélénium radioactif, ont trouvé qu'une partie de la radioactivité était incorporée dans une fraction protéique d'*Escherichia coli* présentant une activité de formiate déshydrogénase. La même observation a été réalisée chez *Clostridium thermoaceticum* (15), *Methanococcus vanielii* et *Clostridium stick landii* (401).

La glycine réductase de *Clostridium* est constituée de plusieurs fractions protéiques, dont l'une a été isolée et purifiée. Il s'agit d'une sélénoprotéine de poids moléculaire faible, de 12.000 environ. L'activité de la glycine réductase dépend étroitement de la présence du sélénium dans le milieu. Récemment, en 1976, CONE et son équipe (79) ont réussi à démontrer que le sélénium existe sous forme de sélénocystéine intervenant dans les phénomènes d'oxydo-réduction.

3.2. ASPECT BIOCHIMIQUE -

3.2.1. - Métabolites séléniés :

Plusieurs dérivés séléniés ont été décrits chez les micro-organismes :

DERIVES	MICRO-ORGANISMES	REFERENCES
Adénosine phospho-sélénate	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> <i>Clostridium nigrificans</i>	(4, 449)
Sélénométhionine	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida albicans</i> <i>Escherichia coli</i>	(32, 171) (422, 439)
S. adénosyl Sélénométhionine	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(275, 392)
Sélénocystine	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida albicans</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Salmonella Thompson</i>	(32) (171) (439)
Sélénocystathionine	<i>Escherichia coli</i>	(439)

Certains micro-organismes sont capables de méthyler le sélénium et de donner naissance à des dérivés volatils et extrêmement toxiques. FLEMING et ALEXANDER (117), en 1972, ont décrit la présence de certains éléments fongiques capables de biosynthétiser le diméthyl-sélénium à partir du sélénium minéral. CHAU et son équipe (68), en 1976, ont identifié trois sortes de bactéries se développant dans les eaux stagnantes de la région d'Ontario au Canada. Il s'agit d'Acromonas, de Flavobacterium et de Pseudomonas. Deux des trois dérivés volatils dégagés par ces bactéries ont été identifiés. Il s'agit du diméthyl-sélénium et du diméthyl-disélénium.

3.2.2. - Substitution du sélénium au soufre :

Mécanisme de toxicité :

Bien que certaines études d'ordre physiologique aient démontré que la toxicité du sélénium relève d'une inhibition compétitive des enzymes qui interviennent dans le métabolisme du soufre, il existe actuellement plusieurs évidences de l'existence de composés séléniés qui agissent aussi bien comme éléments essentiels que des substrats pour certains enzymes. Ainsi, les phénomènes d'adaptation et de tolérance chez Escherichia coli ne vont pas dans le sens d'une inhibition compétitive. Ces dernières observations ont remis en question la notion de toxicité.

Il a été rendu nécessaire d'expliquer cette toxicité soit par la présence d'enzymes incapables de métaboliser les analogues séléniés du soufre et de ses dérivés, soit par l'existence de caractéristiques propres au sélénium telles que le pouvoir oxydant des ions sélénites.

4. LE SELENIUM ET LES PLANTES

4.1. FACTEURS INTERVENANT DANS L'ASSIMILATION DU SELENIUM -

Ces facteurs sont extrêmement importants car ils conditionnent une bonne partie de la toxicologie pathologique du sélénium.

4.1.1. - Les conditions relatives au sol :

- LA CONCENTRATION DE CET ELEMENT DANS LE SOL :

On admet en général qu'un sol contenant 5 ppm de sélénium doit être suspecté comme pouvant fournir des récoltes toxiques pour les animaux.

- LA NATURE DES COMPOSES SELENIES DU SOL, LEURS PROPRIETES PHYSIQUES ET LEUR SOLUBILITE.

- LES AUTRES COMPOSES DU SOL peuvent avoir une action directe sur l'assimilation de la plante. Ainsi, la présence du sulfate peut réduire dans une large mesure l'absorption du sélénium.

- L'ETAT DE SECHERESSE DU SOL.

4.1.2. - Les conditions relatives à la plante :

Les plantes sont classées en plantes accumulatrices et non accumulatrices.

4.2. ABSORPTION -

4.2.1. - Mécanisme :

4.2.1.1. Passif :

Se référant aux données fournies par CARY et son équipe (61) sur l'équilibre existant entre la fraction soluble du sélénium dans le sol et la teneur des plantes en cet élément, il est possible de connaître d'avance la teneur en sélénium d'une espèce végétale donnée se trouvant en contact avec une solution enrichie en cet élément et dont la concentration est connue avec précision. C'est ainsi que pour une concentration en sélénium de 10^{-8} à 10^{-9} M dans l'eau, on retrouvera une teneur de 0,5 ppm dans la plante. Ces valeurs correspondent à un passage effectif de 500 ml de cette solution dans la plante par gramme de matière sèche végétale produite.

4.2.1.2. Actif :

A côté de ce transfert qui tend à réaliser un équilibre entre, d'une part, le compartiment aqueux et, d'autre part, le compartiment végétal, il existe un phénomène de transport actif expliquant en grande partie l'accumulation du sélénium par certaines plantes (ULRICH et SHRIFT - 424). En effet, l'absorption de cet élément est sensiblement réduite par certains inhibiteurs de la respiration.

Ce phénomène de transport actif peut s'appliquer exclusivement à une forme chimique ou à un état d'oxydation donné. Ainsi, BUTLER et PETERSON (52), en 1967, étudiant l'absorption du sélénium par *Spirodela oligorrhiza* à partir de solutions stériles, ont constaté que l'absorption des sélénites était trois fois plus importante que celle des séléniates.

En 1956, LEGGETT et EPSTEIN (225) ont montré l'existence d'une compétition entre les ions sulfates et les ions séléniates vis-à-vis du phénomène de transport actif par les racines de l'orge. Ils en ont tiré la conclusion de la nécessité de l'existence d'un processus d'accumulation spécifique à ces deux ions.

4.2.1.3. Autres mécanismes :

Au cours de l'absorption du sélénium existant à l'état de sélénite, un processus important peut avoir lieu : il s'agit de la réduction de l'ion sélénite en sélénium élémentaire. Ce phénomène n'a pas pu être localisé de façon bien précise, il peut se produire soit à la surface, soit à l'intérieur même de la racine. Ce processus a été observé pour la première fois par SCHREINER et SULLIVAN en 1910 (355), puis par PETERSON et BUTLER en 1962 (310) chez *Neptunia*, et d'une manière encore plus importante dans le seigle et le *Trifolium pratensis*.

4.2.2. - Forme sous laquelle le sélénium est absorbé :

Une étude détaillée sur la distribution du sélénium dans un grand nombre d'espèces végétales a été réalisée par HAMILTON et BEATH (157). Selon ces auteurs, les plantes absorbent beaucoup plus facilement le sélénium à l'état de séléniate que sous sa forme organique, à l'exception de certains cas. Ceci semble être en contradiction avec les observations de TRELEASE et GREENFIELD en 1944 (421) sur les céréales et plusieurs espèces d'*Astragalus*, auxquelles ils ont administré du sélénium sous forme d'acides séléno-aminés et d'autres dérivés azotés.

Cependant, il faut noter que dans les deux cas la culture n'a pas été réalisée dans un sol stérile. Par suite, il serait très probable que la forme sous laquelle le sélénium

ait été administré ne soit pas la même forme sous laquelle il ait été absorbé. En effet, il a été démontré que certains micro-organismes du sol sont capables de convertir le sélénite en sélénium élémentaire, et ce dernier en dérivés organiques dont le diméthyl-sélénium (112).

4.3. METABOLISME - BIOSYNTHESE - DISTRIBUTION -

4.3.1. - Réduction des sélénates en sélénites :

Pour étudier le phénomène de réduction, BUTLER et PETERSON (52) ont réalisé des cultures de *Spirodela oligorrhiza* auxquelles ils ont additionné, d'une manière identique et en quantités égales, du sélénium sous forme : 1) de sélénite et 2) de sélénate, séparément. Quelques jours après, ils ont observé un taux de sélénate beaucoup plus élevé dans la deuxième série que celui de sélénite dans la première. Ils en ont conclu que la réaction de réduction des sélénates en sélénites est une réaction extrêmement lente et que c'est elle qui conditionne la vitesse globale du métabolisme. Cette réaction sera vue ultérieurement.

4.3.2. - Acides séléno-aminés :

4.3.2.1. Plantes non accumulatrices :

Les travaux ont été effectués par BUTLER et PETERSON en 1967 (52), sur l'espèce *Spirodela oligorrhiza*, et par VIRUPAKSHA et SHRIFT (428) sur quatre variétés d'*Astragalus* appartenant à la famille des légumineuses. Selon BUTLER et PETERSON (52), la majeure partie des acides séléno-aminés existant dans la fraction soluble de l'espèce en question était constituée de sélénocystéine et de son dérivé méthylé. Pour les autres variétés d'*Astragalus*, le tableau ci-après fournit en détail la liste des acides séléno-aminés biosynthétisés par les espèces non accumulatrices.

Nous remarquons que la Se-méthyl-sélénométhionine est la forme la plus abondante dans toutes les espèces, suivie par la Se-méthyl-sélénocystéine, mais de façon beaucoup moins importante. On note la présence de deux autres dérivés : la sélénocystathionine et le sélénoglutathion.

D'autres dérivés, dont les composants ont été identifiés après hydrolyse chlorhydrique, semblent être des sélénopeptides. Ils représentent, pour leur part, 10 % du sélénium total existant dans les plantes.

	$^{75}\text{SeO}_4^{--}$	$^{75}\text{SeO}_3^{--}$	$^{35}\text{SO}_4^{--}$
ASTRAGALUS CANADENSIS	Sélénopeptide Se-CH ₃ -Séléno- cystéine Se-CH ₃ -Séléno- méthionine	Sélénopeptide Se-CH ₃ -Séléno- cystéine Se-CH ₃ -Séléno- méthionine	
ASTRAGALUS SUCCULENTUS		idem	
ASTRAGALUS VASEI		idem	Glutathion S-méthyl- méthionine
ASTRAGALUS LENTIGINOSUS		Sélénopeptide Se-méthyl- Séléno- méthionine	idem

D'après VIRUPAKSHA T.K. et SHRIFT A. : Biochemical differences between selenium accumulator and non accumulator Astragalus species. Biochim. Biophys. Acta, 1965, 107, p. 78.

4.3.2.2. Plantes accumulatrices :

Les travaux ont été réalisés par SHRIFT et VIRUPAKSHA (387, 388) sur différentes variétés d'Astragalus (légumineuses), composés et des crucifères (voir tableau ci-après).

La première caractéristique de ces plantes serait leur capacité de métaboliser les dérivés sélénisés inorganiques et de les accumuler sous forme de composés organiques.

L'un des dérivés les plus importants est la Se-méthyl-séléno-cystéine, composant majeur de toutes les espèces étudiées.

D'autres acides séléno-aminés ont été identifiés, parmi lesquels le sélénoglutathion, existant en proportion assez large dans Stanleya pinnata et déjà identifié dans Astragalus pectinatus.

4.3.2.3. Structure chimique :

- Se-méthyl-sélénocystéine.. : $\text{H}_3\text{C}-\text{Se}-\text{CH}_2-\underset{\substack{| \\ \text{COOH}}}{\text{CH}}-\text{NH}_2$
- Se-méthyl-sélénométhionine : $\text{H}_3\text{C}-\text{Se}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\substack{| \\ \text{COOH}}}{\text{CH}}-\text{NH}_2$
- Sélénocystathionine..... : $\text{H}_2\text{N}-\underset{\substack{| \\ \text{HOOC}}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{Se}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\substack{| \\ \text{COOH}}}{\text{CH}}-\text{NH}_2$

	$^{75}\text{SeO}_3$	$^{75}\text{SeO}_4$	$^{35}\text{SO}_4$
ASTRAGALUS CROTALARIAE	Se-CH ₃ -Séléno- cystéine	Se-CH ₃ -Séléno- cystéine Sélénopeptide	S-CH ₃ -cystéine Glutathion
ASTRAGALUS BISCVLATUS	idem	Se-CH ₃ -Séléno- cystéine	idem
ASTRAGALUS PATTERSONI	idem		
ASTRAGALUS RACEMOSUS	Se-CH ₃ -Séléno- cystéine Se-CH ₃ -Séléno- méthionine		
ASTRAGALUS SABULOSUS	Se-CH ₃ -Séléno- cystéine		
ASTRAGALUS PREUSSII	Se-CH ₃ -Séléno- cystéine Se-CH ₃ -Séléno- méthionine Sélénopeptides		idem
OONOPSIS CONDENSATA		Se-CH ₃ -Séléno- cystéine	
STANLEYA PINNATA var. BIPINNATA		Se-CH ₃ -Séléno- cystéine Se-Cystathionine Sélénopeptide	

D'après SHRIFT A. et VIRUPAKSHA T.K. : Seleno-amino acids in selenium accumulating plants. Biochim. Biophys. Acta, 1966, 100, p. 71.

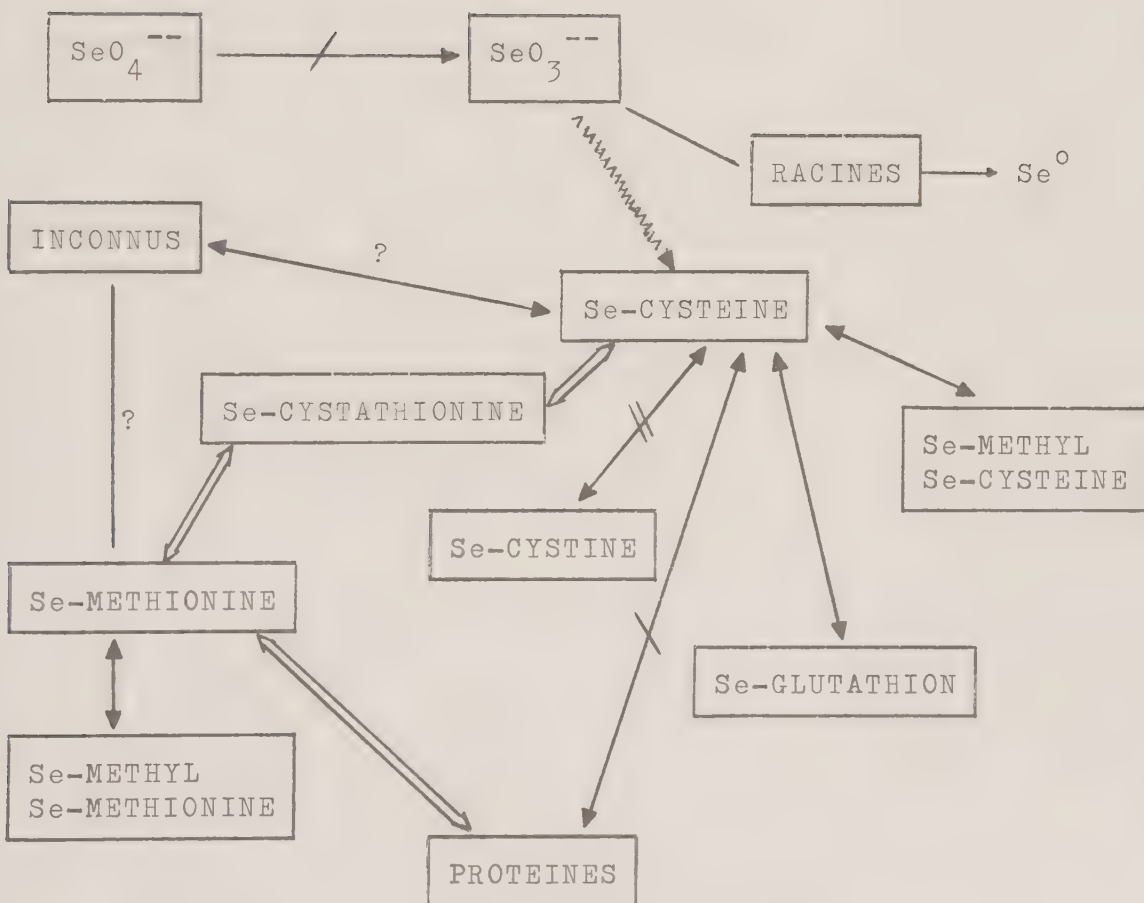
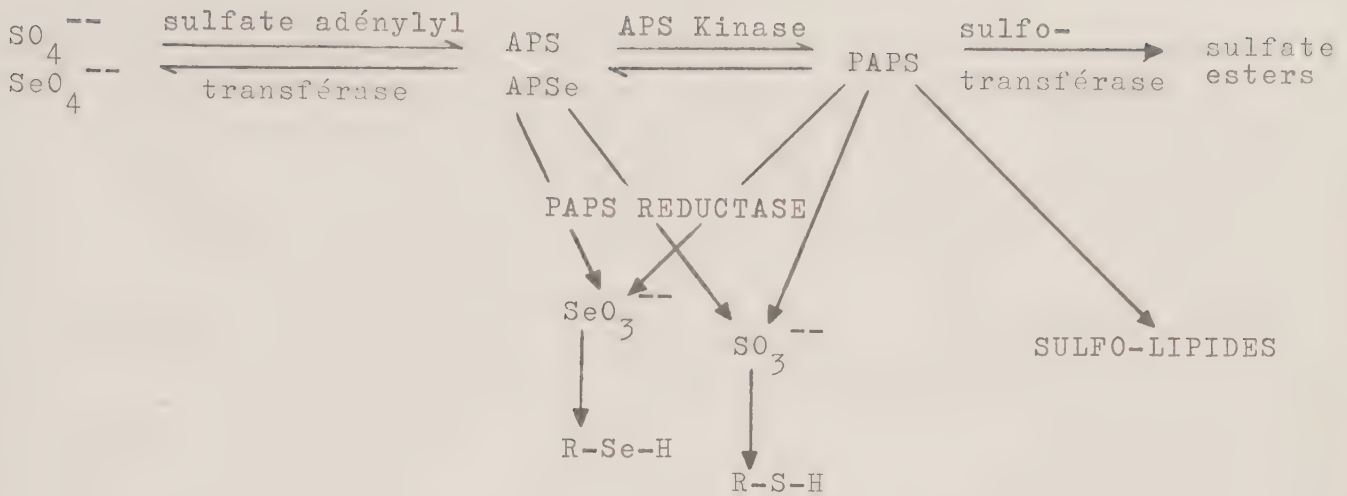
4.3.2.4. Biosynthèse :

Le mécanisme par lequel les acides séléno-aminés sont synthétisés à partir des sélénates et des sélénites semble se rapprocher de celui des sulfates. En effet, à plusieurs métabolites soufrés, correspondent des analogues sélénés. C'est le cas de la Se-méthyl-sélénocystéine et de la S-méthyl-cystéine, puis de la Se-méthyl-sélénométhionine et de la S-méthyl-méthionine.

Or, dans le métabolisme du soufre et lors de la réduction des sulfates en sulfites, deux intermédiaires existent : l'adénosine 5'phosphosulfate (APS) et le 3'phospho-adénosine 5'phosphosulfate (PAPS). Par analogie avec le soufre, on devrait s'attendre, dans le cas du sélénium, à avoir les deux intermédiaires correspondants : adénosine 5'phospho-sélénate (APSe) et 3'phospho-adénosine 5'phospho-sélénate. Cependant, une différence nette a été décrite entre les deux éléments chez les espèces accumulatrices. Il s'agit de l'incapacité de ces dernières de synthétiser le sélénoglutathion à partir des sélénites et des séléniates, bien qu'elles soient capables de biosynthétiser le glutathion à partir du sulfate. De même, les espèces non accumulatrices du genre *Astragalus* sont capables de produire du Se-méthyl-sélénométhionine à partir des sélénites, mais incapables de produire la Se-méthyl-sélénométhionine à partir des séléniates.

NISSEN et BENSON (284) ont réussi à expliquer et à démontrer le non parallélisme entre le sélénium et le soufre lors de la première étape de réduction. Alors que les sulfates présentent deux intermédiaires, APS et PAPS, la réduction des séléniates en sélénites n'en fait intervenir qu'un seul : APSe. Ceci permet d'expliquer l'absence de cholines séléniates et de séléno-lipides dans toutes les plantes étudiées.

La voie métabolique proposée par ces deux auteurs serait la suivante (p. 26) :



D'après ALLAWAY W.H., CARY E.E. et EHLIG C.F. : The cycling of low levels of selenium in soils, plants and animals. In O.H. MUTH (Edit.), symposium : Selenium in Biomedicine. Avi. Publ. Co. Connecticut, Westport, p. 283.

↗ mécanisme non établi
 ↗ réaction lente
 ⇌ voie importante chez les espèces non accumulatrices
 / voie secondaire chez les espèces non accumulatrices

4.3.3. - Dérivés volatils :

L'odeur caractéristique des dérivés sélénisés a été mise en évidence chez certaines espèces sélénifères tenues responsables du mauvais goût que présentait le fourrage pour le bétail (TRELEASE et BEATH - 420). Ces mêmes auteurs ont démontré la possibilité de dégagement de dérivés organo-sélénisés volatils à partir du fourrage sec et des graines de céréales stockées.

Plusieurs études ont été réalisées dans le but :

- de déterminer les possibilités et le taux de volatilisation du sélénium à partir des plantes intactes ou exposées à la dessiccation dans une étuve maintenue à température constante ;
- d'isoler et d'identifier les dérivés volatils concernés.

LEWIS et son équipe (237) ont étudié en détail ce phénomène chez les algues. Ils ont trouvé que la quantité de sélénium dégagée sous forme de dérivés volatils pendant la journée n'est pas constante. Elle varie, pour passer par un maximum au début de l'après-midi ; la majeure partie provient de la partie aérienne, une faible proportion est dégagée par les racines.

La chromatographie en phase gazeuse, l'extraction successive à l'aide de plusieurs solvants et la chromatographie par échange d'ions ont été utilisées en vue d'isoler et d'identifier les composés en question. Chez plus d'une douzaine d'espèces, les travaux ont montré qu'il existe quatre dérivés majeurs, dont l'un est le diméthyl-disélénium $\text{CH}_3\text{-Se-Se-CH}_3$. La présence de ces dérivés dans les plantes accumulatrices n'est pas évidente. Un autre dérivé, le diméthyl-sélénium, a été aussi identifié. Il est produit par certaines espèces d'Astragalus. Cependant, son taux ne dépasse guère 5 % du sélénium total volatil.

4.4. DISTRIBUTION -

L'élément ne se fixe pas d'une manière uniforme dans les différentes parties de la plante, mais aucune loi ne semble régler cette répartition. Cependant, on constate souvent que les racines et les semences sont avides de cet élément. En effet, les racines des céréales et des herbes de pâturage renferment des teneurs en sélénium 2 à 23 fois supérieures à celles des parties aériennes, quelle que soit la concentration à laquelle les plantes se trouvent exposées. Il en est de même pour un grand nombre d'autres espèces : tomate, épinard, tournesol, oignon, et certaines plantes accumulatrices : Stanleya pinnata, Neptunia amplexicaulis et la majeure partie des Astragalus, à l'exception de quelques-unes.

Chez les semences elles-mêmes, le sélénium n'est pas fixé d'une façon homogène ; c'est ainsi que dans l'étude des grains de blé séléniés, on n'en trouve pas trace dans l'amidon, alors qu'il est accumulé dans les protéines. On le trouve, en outre, dans l'huile extraite des farines de crucifères séléniés, tandis que le tourteau n'en contient pas. Peut-être, faut-il en voir la raison dans l'analogie chimique du soufre et du sélénium : le premier, d'une part, entrant dans la constitution des protéines et, d'autre part, s'accumulant dans les huiles des crucifères.

4.5. PLANTES ACCUMULATRICES ET NON ACCUMULATRICES -

4.5.1. - Plantes accumulatrices primaires :

Il s'agit de certaines variétés de plantes qui ne peuvent pousser que dans une région hautement sélénifère (1 - 50 ppm). Elles présentent la caractéristique de pouvoir accumuler du sélénium en quantités telles que les plantes deviennent toxiques pour les animaux qui s'en nourrissent (100 à 10.000 ppm).

Ces plantes appartiennent à la famille des légumineuses, genre *Astragalus* (24 espèces) de teneur >1.000 ppm, aux composés, genre *Xylorrhiza* >120 ppm (5 espèces), *Oenopsis* : 800 ppm (6 espèces), et aux crucifères, genre *Stanleya* : 700 ppm (7 espèces).

On note l'absence de ces plantes accumulatrices dans les régions non sélénifères. Par contre, en Nouvelle-Zélande, dans une région pauvre en sélénium, WATKINSON (435) a mis en évidence une teneur assez élevée en cet élément chez un champignon (*Amanita muscaria*).

Ces plantes présentent un double intérêt : elles indiquent si les sols sur lesquels elles se sont développées sont séléniés ou non, c'est pourquoi on les appelle végétaux indicateurs. Elles font passer le sélénium des formes insolubles en formes solubles et même volatiles. Elles enrichissent ainsi le sol en formes solubles par l'action des eaux de pluie et par leurs débris ; aussi, les appelle-t-on "végétaux convertisseurs". En outre, la grande volatilité des dérivés séléniés contenus dans les plantes veut que celles-ci soient analysées à l'état vert, et non sec.

4.5.2. - Plantes accumulatrices secondaires :

Ce groupe comprend des plantes qui accumulent secondairement le sélénium et qui poussent sur des sols sélénifères ou non. Elles contiennent 25 à 100 ppm, elles comprennent les espèces suivantes : *Aster* (72 ppm), *Gutierrezia* (60 ppm), *Atriplex* (50 ppm), *Grindelia* (38 ppm), *Castilleja* et *Comandra*.

4.5.3. - Plantes non accumulatrices :

Il s'agit d'espèces rencontrées le plus souvent dans les régions non sélénifères. Expérimentalement, ces plantes sont incapables d'accumuler le sélénium qui semble inhiber leur croissance lorsqu'il s'y trouve à une teneur favorable à la croissance et à la reproduction des espèces accumulatrices. Elles renferment 1 à 25 ppm.

4.5.4. - Distinction entre plantes accumulatrices et non accumulatrices :

La différence entre ces deux groupes ne réside pas dans le phénomène d'absorption. En effet, ULRICH et SHRIFT (424) ont travaillé sur deux espèces différentes : l'une accumulatrice, l'autre non. Ils ont trouvé, quelques jours après, la même teneur en sélénium dans les racines des deux plantes exposées à la même concentration en sélénium.

La distinction entre les deux groupes repose sur le métabolisme proprement dit, la nature des différents métabolites et l'abondance relative de chacun d'entre eux. Le tableau donné par VIRUPAKSHA et SHRIFT illustre bien cette situation.

	Se-méthyl- Sélénio- cystéine	Se-méthyl- Sélénio- méthionine
- PLANTES ACCUMULATRICES :		
Astragalus crotatoriaceae.....	+++	-
A. bisculatus.....	+++	-
A. subulosus.....	+++	-
A. racemosus.....	+++	+
A. preussii.....	+++	+
Oonopsis condensata.....	+++	-
Stanleya pinnata.....	+++	-
- PLANTES NON ACCUMULATRICES :		
Astragalus canadensis.....	++	+++
A. vasei.....	++	+++
A. succulentus.....	+	+++
A. lentiginosus.....	-	+++

D'après WIRUPAKSHA T.K. et SHRIFT A. : Biochemical differences between selenium accumulator and non-accumulator Astragalus species. Biochim. Biophys. Acta, 1965, 107, p. 78.

5. METABOLISME

5.1. ABSORPTION -

5.1.1. - Absorption gastro-intestinale :

L'absorption du sélénium à partir du tractus gastro-intestinal varie d'un dérivé à un autre. Le sélénium élémentaire n'est pas absorbé, son action irritante sur la muqueuse gastro-intestinale limite son absorption par cette voie. Par contre, les sélénites et les séléniates le sont facilement (211) ; il en est de même pour la sélénométhionine (400) et d'autres dérivés organiques présents dans les graines des céréales.

L'absorption des différents dérivés du sélénium à partir du tractus gastro-intestinal a été étudiée pour la première fois par WRIGHT et BELL (455) en 1966, aussi bien chez les ruminants que chez les espèces monogastriques. Ils ont utilisé pour cela des dérivés marqués au Se^{75} , additionnés d'oxyde de chrome, produit ne traversant pas la muqueuse gastro-intestinale, et ils ont évalué le rapport $\text{Se}^{75}/\text{Cr}_2\text{O}_3$ pour chaque dose utilisée. Administré par voie orale, le sélénium n'est pas absorbé à partir du rumen et de la caillette du mouton, ni à partir de l'estomac du porc.

Aussi bien chez les ruminants que chez les monogastriques, le sélénium est sécrété au niveau du duodénum. Il a été retrouvé dans la bile, dans les sécrétions intestinales et pancréatiques.

Son absorption aurait lieu au niveau de la partie distale de l'intestin grêle. Aucun phénomène d'absorption ou de sécrétion n'a lieu au niveau du caecum et du côlon.

Mc CONNELL et CHO (246, 247, 248) ont rapporté l'existence d'un phénomène de transport actif pour la sélénométhionine à travers la muqueuse de l'intestin du hamster in vitro. Ce phénomène n'a pas lieu pour les sélénites et la D.L-sélénocystine. Le transport de la L-sélénométhionine est inhibé, sinon réduit, par la présence de la méthionine qui agit par compétition, alors que l'absorption des sélénites et de la D.L-sélénocystine n'est pas touchée par la présence de sulfites et de la D.L-cystine, respectivement.

Les dérivés du sélénium peuvent subir une biotransformation au niveau du tractus gastro-intestinal, influençant beaucoup leur absorption. En effet, la radioactivité des tissus chez les moutons, à la suite de l'administration de radioséléniate, est supérieure à celle obtenue avec le radiosélénite. Il se peut que cette différence de radioactivité soit liée au

degré de résistance de ces deux sels aux bactéries de l'intestin, puisqu'il a été rapporté que certaines bactéries telles que le colibacille, qui est un hôte normal de l'intestin, réduisent le sélénite alors qu'elles ne peuvent en faire autant avec le séléniate.

Au niveau du rumen, il peut y avoir une réduction du sélénium. WRIGHT et BELL (455) ont étudié en détail ce mécanisme à la suite de la mise en évidence de plusieurs micro-organismes capables de réduire le sélénium. Ils ont travaillé sur deux espèces différentes : un ruminant, le mouton, et un non ruminant, le porc. A la suite d'une administration orale de sélénium sous forme de sélénite de sodium à une teneur de 0,35 et 0,50 ppm dans la nourriture, respectivement chez les deux espèces, l'absorption globale du sélénium administré n'excédait pas 35 % chez le mouton, alors qu'elle atteignait 85 % chez le porc. Plus tard, HIDIROGLOU et JENKINS (179), afin d'étudier le métabolisme des différentes formes du sélénium chez les ruminants, ont utilisé deux lots de moutons, dont l'un a reçu par voie intra-ruminale et l'autre directement dans la caillette, une seule dose de sélénium sous les formes successives suivantes : sélénométhionine, sélénocystine, sélénite et séléniate de sodium radioactifs. Des radioactivités supérieures ont été enregistrées dans les différents tissus et dans le sang des animaux auxquels ils ont administré le sélénium dans la caillette. L'élimination par les fèces a été beaucoup plus importante lorsque l'administration a eu lieu par voie intra-ruminale.

Dans le rumen qui constitue un véritable réservoir de fermentation, les phénomènes de réduction sont sans doute beaucoup plus poussés que dans le reste du tube digestif. Cette fermentation intense explique une réduction plus poussée du séléniate et du sélénite par les micro-organismes spécifiques au rumen que par les bactéries de l'intestin, expliquant la chute de l'absorption et l'augmentation de l'excrétion fécale.

Ces micro-organismes sont, d'autre part, capables de synthétiser les analogues séléniés des acides aminés tels que la D.L-cystine et la L-sélénométhionine à partir du sélénium inorganique (sélénite) - (309, 338). Ces dérivés seraient en partie incorporés dans la fraction protéique des micro-organismes (177), le reste est absorbé en majeure partie au niveau de la première partie de l'intestin grêle.

L'absorption du sélénium augmente à la suite d'une carence en cet élément. Ceci a été démontré par JENSEN chez les poussins (197) et par WRIGHT et BELL (454) chez les moutons. Parallèlement, on remarque une baisse importante de l'excrétion (184, 454).

5.1.2. - Absorption pulmonaire :

La voie pulmonaire constitue en milieu industriel la principale voie d'entrée du sélénium et de ses dérivés dans l'organisme. Le dioxyde de sélénium et l'hydrogène sélénié sont facilement absorbés par cette voie (134).

5.1.3. - Absorption cutanée :

Apparemment, aucun dérivé du sélénium n'est absorbé lorsqu'il est appliqué sur la peau saine. Cependant, l'action vésicante, corrosive et nécrosante de l'oxychlorure de sélénium, crée une source de continuité dans la peau et permet la pénétration de ce métalloïde dans le corps. Cet effet vésicant a été étudié par DUDLEY (100), en 1938, sur la peau du lapin.

Le sulfure de sélénium se prête, lui aussi, à une absorption cutanée (211).

L'absorption cutanée de l'acide sélénieux et du dioxyde de sélénium, à la suite de l'exposition de la peau à des quantités variables de ces composés, est négligeable (211).

5.2. TRANSPORT DU SELENIUM DANS LE SANG -

La fixation du sélénium par les érythrocytes et les protéines plasmatiques, et son transport, ont été étudiés en détail par JENKINS (196), HERRMAN et Mc CONNELL (176).

Les hématies, d'origine humaine ou non, présentent la propriété de pouvoir fixer et concentrer le sélénium in vivo et in vitro (224, 453).

LEE (224) a subdivisé le phénomène de fixation du sélénium par les hématies en deux : l'absorption et l'excrétion, indépendantes l'une de l'autre.

Mc CONNELL et CHO (248) ont proposé deux voies différentes pour le mécanisme de transport du sélénium dans le sang :

- 1^{ère} voie :

INJECTION SOUS-CUTANEE
DE Se75

↓
DERIVES INORGANIQUEs
DANS LE PLASMA

→ FIXATION AUX
PROTEINES PLASMATIQUES

→ FIXATION AUX
HEMATIES

- 2^{ème} voie :

INJECTION SOUS-CUTANEE
DE Se75

↓
DERIVES INORGANIQUEs
DANS LE PLASMA

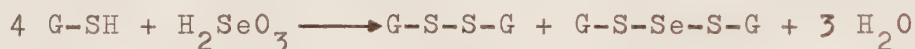
→ FIXATION AUX
PROTEINES PLASMATIQUES

↓
FIXATION AUX
HEMATIES

5.2.1. - Fixation par les hématies :

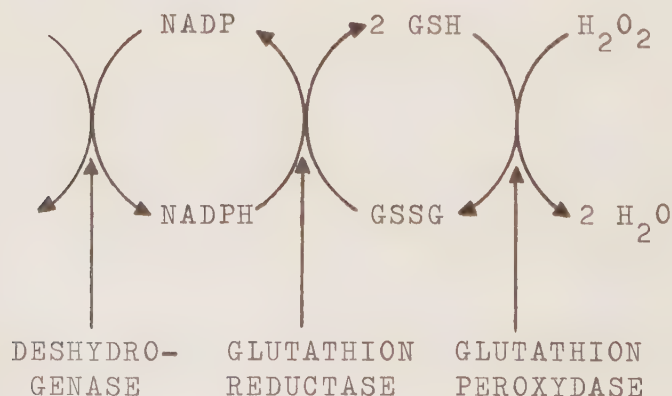
SANDHOLM (347, 348), en 1973, a étudié en détail ce mécanisme de transport. L'étude a été réalisée sur les souris in vivo et sur le sang de vache in vitro avec du sélénite marqué. Il a démontré que la fixation du sélénium par les hématies précède toujours sa fixation par les protéines plasmatiques. Il a étudié aussi les mécanismes d'absorption et d'excrétion du sélénium par les érythrocytes, et il lui est apparu que ces deux mécanismes ne sont pas identiques : alors que l'excrétion est liée étroitement à la présence du glutathion à l'état réduit à l'intérieur des cellules, l'absorption n'en dépend cependant que très peu ; en effet, elle est réduite partiellement par certains réactifs tels que l'iodoacétamide qui bloque les groupements sulfydryls libres SH du glutathion. Cette absorption présente un mécanisme de transport actif puisqu'elle est inhibée par les cyanures, inhibition suivie de la chute de la consommation en oxygène.

L'intervention du glutathion dans les phénomènes d'excrétion et d'absorption est évidente. L'administration orale ou l'injection sous-cutanée de sélénite de sodium entraînent une baisse de la teneur en glutathion à l'état réduit, aussi bien dans le sang que dans le reste des organes. En effet, les sélénites, traversant les parois membranaires des hématies, vont réagir avec les groupements SH libres du glutathion pour donner :



Au fur et à mesure que l'absorption continue, les sélénites sont réduits et les électrons nécessaires à cette réduction proviennent essentiellement du glutathion.

Une faible quantité de sélénium à l'intérieur des érythrocytes stimule le transport des électrons à l'oxygène. En effet, dans les érythrocytes incubés de sélénite, on a remarqué que la production d'oxygène à partir du peroxyde d'hydrogène, sous l'action du glutathion, est augmentée. ROTRUCK (344) a démontré que le sélénium possède la propriété de pouvoir activer la glutathion peroxydase. Le mécanisme serait le suivant :



La manière dont le sélénium sera fixé ultérieurement aux protéines plasmatiques après sa concentration à l'intérieur des hématies est encore discutée. On pense actuellement que le composé G-S-Se-S-G, par analogie structurale avec G-S-S-G, est capable de traverser la membrane cellulaire des érythrocytes et de réagir à la suite de son excrétion avec les différentes protéines plasmatiques suivant une réaction d'échange :



Cette réaction est possible non seulement à partir du glutathion, mais aussi à partir de la cystéine et de la CoA-SH.

5.2.2. - Fixation par les protéines plasmatiques :

A la suite de son excrétion, le sélénium est fixé par l'albumine. Mc CONNELL et HERRMAN (176) ont retrouvé chez le chien, une heure après l'injection sous-cutanée de Se75 tétrachlorure de sélénium, 40 % de la radioactivité liée à la fraction albuminique. La nature de la liaison entre le sélénium et l'albumine reste inconnue. Il semble qu'il s'agisse d'un complexe dans lequel, à un atome gramme de sélénium, correspondent trois molécules de glutathion (348). Le sélénium est transféré ultérieurement aux autres protéines (348).

Chez l'homme, les récents travaux de SANDHOLM (349) et de BURK (45) ont montré que la majeure partie de la radioactivité est liée à la fraction lipoprotéique. Ces travaux peuvent être résumés ainsi :

SANDHOLM (349), en 1975, a étudié in vitro la fixation du sélénium par les protéines plasmatiques d'origine humaine et a confirmé les travaux précédents sur la nécessité du passage du sélénium par les érythrocytes avant sa fixation par les protéines. Il en a tiré deux conclusions : à la suite de l'addition in vitro du sélénite marqué au sang humain, on constate que la majeure partie de la radioactivité liée aux protéines est liée, 5 minutes après, à la fraction bêta-lipoprotéique, alors que pour une durée d'incubation de 60 minutes la radioactivité est partagée entre la fraction bêta-lipoprotéique et une fraction non encore identifiée, migrant entre les α_1 et α_2 -lipoprotéines par immuno-électrophorèse.

Les travaux de BURK (45) semblent être plus complets et plus cohérents car ils ont été effectués in vivo chez l'homme. A la suite d'une injection intra-veineuse de Se75 sélénite de sodium, la teneur en sélénium diminue très rapidement dans le plasma pour augmenter parallèlement dans les érythrocytes, ce Se75 n'étant pas lié aux protéines. 6 heures après l'injection, la totalité du sélénium marqué sera fixée

par les protéines. 72 heures après, la radioactivité des hématies marque une certaine hausse qui correspond aux érythrocytes arrivant à maturité, renfermant de la glutathion peroxydase dans laquelle le sélénium marqué s'est introduit après l'injection.

L'analyse des protéines plasmatiques montre que la majeure partie de la radioactivité introduite se retrouve au niveau des lipoprotéines de très faible densité ($d < 1,006$) et de faible densité ($1,006 < d < 1,063$) : bêta-lipoprotéines, et peu au niveau de la fraction lipoprotéique de densité élevée ($1,063 < d < 1,210$) : α_2 et α_1 -lipoprotéines.

La radioactivité liée à la fraction de très faible densité diminue plus vite que celle liée à la fraction de faible densité. Ceci est fonction du turn over de ces lipoprotéines et de la conversion de la fraction de très faible densité en faible densité (31).

Ces lipoprotéines comportent une protéine commune qui est une apoprotéine B n'existant pas dans la fraction à densité élevée. Le sélénium est probablement lié à cette apoprotéine.

La plus grande partie de la radioactivité peut être séparée des protéines par simple dénaturation de ces dernières, à la suite d'addition d'une solution d'urée 8 M. L'addition de mercaptoéthanol à 0,5 M déplace tout le sélénium. Ceci confirme la nature de liaisons séléno-protéiques, il s'agit de ponts disulfures.

In vitro, peu de radioactivité est retrouvée au niveau de la fraction lipoprotéique, le reste étant à l'état libre. Ceci suppose la présence d'un facteur existant in vivo et dont la présence est indispensable à la fixation.

48 heures après l'injection, le traitement des fractions lipoprotéiques avec du mercaptoéthanol n'aboutit pas aux mêmes résultats. Il s'agirait d'un autre mode de liaison encore non identifié.

5.3. METABOLISME PROPREMENT DIT -

5.3.1. - Les séléniates :

Les séléniates ne sont toxiques qu'à la suite de leur réduction en sélénités. Cette réduction a lieu au niveau du foie, de la rate et du sang (289).

La réduction des séléniates en sélénités a été déjà décrite chez les micro-organismes. Elle suit chez l'homme aussi, à quelques exceptions près, le même chemin que les sulfates. Cette réduction est enzymatique et énergétique, nécessitant la présence d'ATP dans le milieu.

5.3.2. - Les sélénites :

Deux principaux métabolites du sélénium ont été déjà identifiés. Il s'agit du diméthyl-sélénium (249) et du triméthyl-sélénium (54, 300).

Le métabolisme des sélénites et la biosynthèse de ces différents dérivés ont été longuement discutés. Les premiers travaux ayant abouti à des résultats concrets sont ceux de GANTHER en 1966 (126), qui a exploré le mécanisme de réduction du sélénium de l'état +4 à l'état -2. Il a, pour cela, étudié le processus in vitro sur le foie du rat, et en a tiré les conclusions suivantes : il s'agit d'un processus enzymatique caractérisé par :

- une activité optimale pour des conditions anaérobiques ;
- la nécessité de la présence du glutathion à l'état réduit (GSH) ;
- la NADPH qui stimule ce processus ;
- la S-adénosyl-méthionine qui intervient en tant que donneur de groupement méthyl ;
- et l'inhibition du phénomène par les ions arsénites.

Ces faits indiquent que le passage du Se^{+4} en Se^{-2} nécessite la présence d'une ou plusieurs réductases associées à la NADPH et la présence d'une transférase au moins.

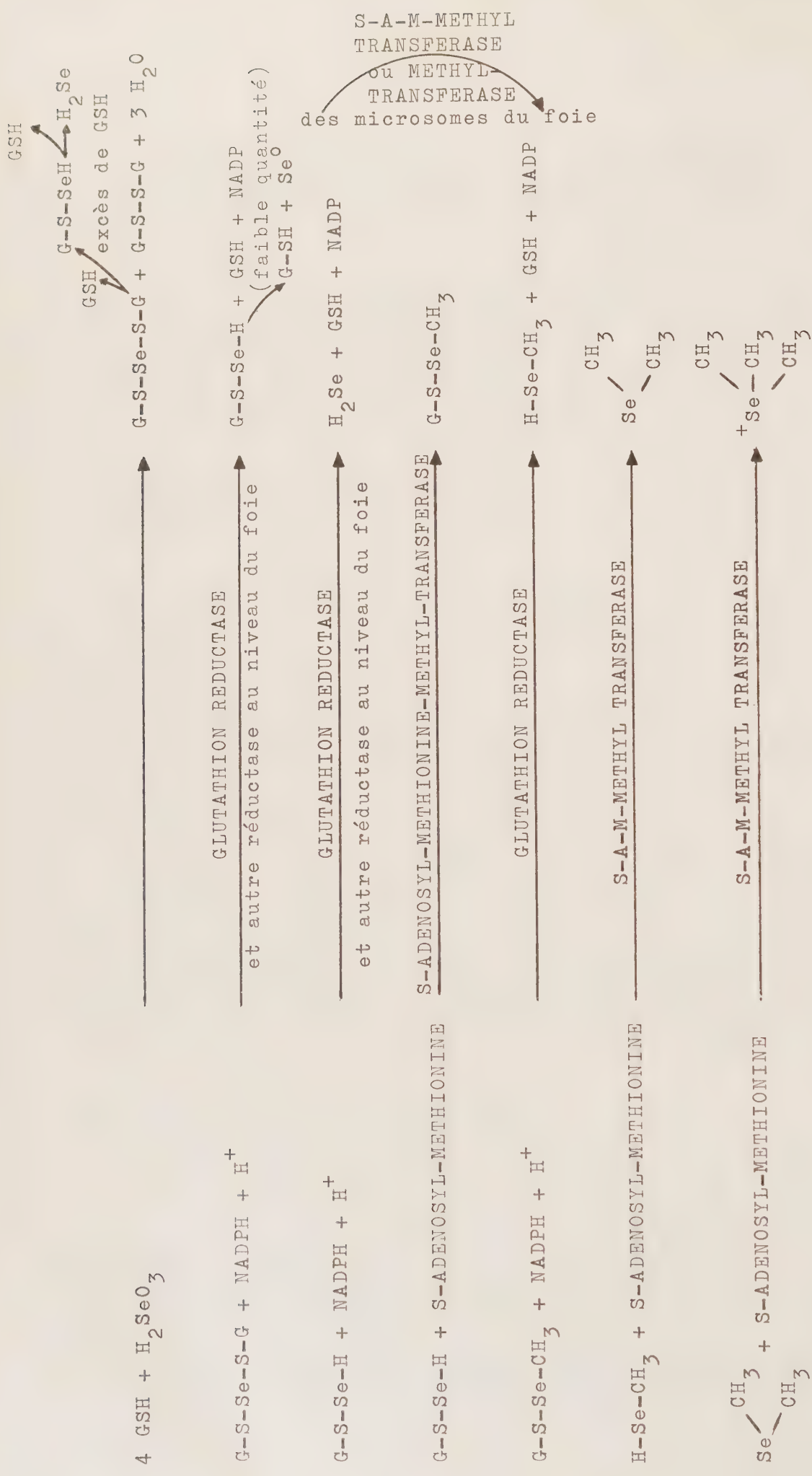
L'inhibition importante pour les ions arsénites présents à l'état de traces amène à penser à l'existence d'un site actif enzymatique à groupements thiols. D'autre part, la préférence du système pour le glutathion sur d'autres composés possédant des groupements SH, comme le mercapto-éthanol, montre que le rôle du glutathion dépasse celui d'un stabilisateur des groupements SH ou celui d'un agent réducteur (126). La participation du glutathion en tant que dérivé intermédiaire est évidente puisqu'on a démontré ultérieurement (128) l'existence, dans ce mécanisme, d'un enzyme : la glutathion réductase qui implique absolument la présence du glutathion.

En partant de ces considérations et en fonction des résultats observés plus tard par GANTHER et HSIEH (131), on a décrit un schéma détaillé, bien qu'encore incomplet, du métabolisme du sélénium (voir tableau p. 37).

5.3.2.1. La réduction :

Le sélénium à l'état Se^{+4} est capable de réagir avec le glutathion (127). Il s'agit d'une réaction non enzymatique aboutissant à la formation d'un intermédiaire de métabolisme G-S-Se-S-G :





En 1971, GANTHER (128) a étudié en détail l'activité et les propriétés du métabolite G-S-Se-S-G en tant que substrat pour la glutathion réductase par analogie de structure avec G-S-S-G. En effet, il a démontré que la glutathion réductase, isolée à partir des levures, oxyde rapidement la NADPH en présence de G-S-Se-S-G suivant la réaction :



La formation de G-S-Se-H a été vérifiée (128). En effet, l'addition au milieu d'iodo-acétate a permis d'isoler ce dérivé sous forme d'un dérivé carboxy-méthylé.

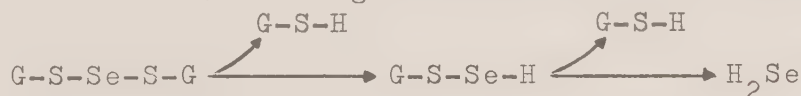
Cependant, la mesure de la quantité de NADPH consommée au cours de la réduction du G-S-Se-S-G montre la possibilité d'une réduction plus poussée, aboutissant à la formation de H_2Se . Cette étape nécessite, elle aussi, la présence d'une glutathion réductase :



Le H_2Se est volatil, une légère acidification du milieu entraîne une perte considérable (128).

La première étape est non enzymatique, alors que la deuxième et la troisième nécessitent la présence d'une glutathion réductase, enzyme possédant un site actif avec deux groupements thiols SH. Ceci permet d'expliquer le blocage du métabolisme des sélénites par les ions arsénites (260).

Cependant, GANTHER et HSIEH (131) ont démontré que, parallèlement à cette voie enzymatique, il existe une deuxième voie ne nécessitant pas la présence de NADPH, ni de la glutathion réductase. Il s'agit de la réaction suivante :



Cette voie a lieu en présence d'un excès de glutathion. La quantité produite de H_2Se est minime.

5.3.2.2. La méthylation :

HSIEH et GANTHER (131) ont réussi à dissocier les deux phénomènes de méthylation et de réduction. Ils ont travaillé sur les reins, dont ils ont isolé la fraction soluble. Cette dernière, chromatographiée sur une colonne de Séphadex G75, donne quatre fractions :

- Fraction A constituée de protéines dont le poids moléculaire est supérieur à celui de l'Hb.
- Fraction B constituée d'Hb.

- Fraction C constituée de protéines de poids moléculaire voisin de 30.000.
- Et une fraction D constituée de protéines de poids moléculaire voisin de 10.000.

La fraction soluble d'origine rénale est capable de synthétiser le diméthyl-sélénium à partir des sélénites. La recombinaison de toutes les fractions restaure l'activité initiale.

L'activité, aussi bien de la fraction soluble que de celle de C, est inhibée à la suite d'addition d'arsénite, mais alors que l'activité de C est restaurée à la suite de la dialyse, celle de la fraction soluble ne l'est pas. Ceci laisse penser que, dans le cas de la fraction C, l'arsénite réagirait avec les intermédiaires du métabolisme, alors que dans le cas de la fraction soluble, il s'agit d'une liaison entre une protéine enzymatique et l'arsénite au niveau de groupements SH du site actif puisque l'inhibition est irréversible par dialyse.

Le fractionnement de C sur une colonne de DEAE cellulose a abouti à plusieurs composants, dont le C IIIa qui garde l'activité de C. On a démontré qu'il s'agit d'une protéine, méthyl-transférase, insensible aux ions arsénites, ayant pour substrat le H_2Se produit d'une manière enzymatique ou non.

A et B seraient constituées de la glutathion réductase.

Au niveau du foie, les microsomes jouent le rôle de la fraction C rénale. Mais cependant, la méthyl-transférase, à ce niveau, semble posséder des groupements thiols SH. Cet enzyme est complètement inhibé, et d'une manière irréversible après dialyse, par les arsénites.

Une autre fraction, identique à la fraction C, existe normalement. Elle est insensible aux ions arsénites.

La fraction A provenant du foie comporte, à côté de la glutathion réductase, une deuxième réductase non encore identifiée.

5.3.3. - Les acides séléno-aminés :

Leur métabolisme, et en particulier leur synthèse, suivent la même voie que les acides aminés soufrés.

5.4. PASSAGE A TRAVERS LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE ET TRANSFERT PLACENTAIRE -

5.4.1. - Barrière hémato-encéphalique :

Le passage du sélénium à travers la barrière hémato-encéphalique a été démontré par TRAPP et MILLAN (419) en 1975. Deux heures après l'administration de sélénite marqué, de la radioactivité est détectée au niveau du cerveau.

Ce passage n'a pas encore été expliqué. On ignore la forme sous laquelle le sélénium pénètre. Plusieurs hypothèses ont été émises : il peut s'agir aussi bien de la forme combinée au glutathion G-S-Se-S-G que d'un acide sélénaminé. La forme sous laquelle le sélénium est accumulé n'est pas connue, il semble qu'il soit incorporé dans les protéines riches en cystine.

Sa rétention dans la matière grise est la plus élevée, il s'accumule au niveau du nerf optique ; en effet, la moitié de la radioactivité totale du cerveau est retrouvée à ce niveau.

5.4.2. - Transfert placentaire :

Ce passage a été revu en détail par WRIGHT (452). Il a été décrit chez le rat (444), le mouton (49, 454), le chien (251) et la souris (161).

Les concentrations en sélénium dans les muscles et dans le foie, aussi bien chez le fœtus que chez la mère, sont fonction de la quantité administrée.

Le passage du Se^{75} à travers la membrane placentaire tend vers un équilibre qui n'est pas immédiat (454) ; le rapport Se maternel / Se fœtal est constant.

5.5. DISTRIBUTION ET ELIMINATION -

5.5.1. - Généralités :

La distribution du sélénium dans les différents organes, ainsi que son élimination, sont difficiles à interpréter. Les difficultés proviennent de :

- la façon avec laquelle les résultats obtenus sont exprimés : par unité de poids, par organe, ou en pourcentage de la dose totale administrée ;
- l'utilisation d'espèces animales différentes ;
- la voie d'administration ;
- la dose administrée ;

- l'état général du sujet ;
- la forme organique ou minérale sous laquelle le sélénium est administré ;
- et la teneur en sélénium de la ration alimentaire.

Certaines généralisations seraient cependant possibles.

5.5.2. - Etude cinétique :

5.5.2.1. Sélénite :

LEIBETSEDER et son équipe (226) ont étudié le métabolisme et la distribution du sélénite de sodium chez le porc à la suite d'une seule injection intra-veineuse de 1 mCi de Se^{75} sélénite de sodium, d'activité spécifique de 1 à 10 mCi/mg de sélénium. La radioactivité du compartiment plasmatique a été mesurée de 4 en 4 minutes, pendant les 14 jours qui ont suivi l'administration. La chute de la radioactivité est donnée par l'équation :

$$\gamma\pi = 0,39850 \text{ ex}(- 44,543 \text{ t}) + 0,13538 \text{ ex}(- 4,725 \text{ t}) \\ + 0,02144 \text{ ex}(- 1,650 \text{ t}) = 0,09456 \text{ ex}(+ 0,042 \text{ t})$$

où $\gamma\pi$ est le pourcentage de Se^{75} injecté par μg de sélénium dans le plasma, t est le temps écoulé après l'injection et exprimé en heures.

Comme on le remarque, la majeure partie de la radioactivité dans le compartiment plasmatique disparaît au bout d'une heure. Ceci est dû essentiellement à la fixation du sélénium par les globules rouges.

Certains paramètres physiologiques concernant le sélénium ont été déterminés. Il s'agit du taux de transfert et de la durée de demi-vie biologique dans chaque organe. Le tableau ci-dessous donne les différentes valeurs trouvées.

ORGANE	TAUX DE TRANSFERT $\mu\text{g/g/heure}$	DUREE DE DEMI-VIE BIOLOGIQUE (JOURS)
Reins.....	$1,02 \cdot 10^{-3}$	52,19
Foie.....	$2,01 \cdot 10^{-4}$	144,14
Coeur.....	$1,77 \cdot 10^{-4}$	48,47
Os.....	$6,32 \cdot 10^{-5}$	47,50
Muscles striés...	$2,11 \cdot 10^{-5}$	67,05
Cerveau.....	$8,07 \cdot 10^{-6}$	506,30
Peau.....	$2,84 \cdot 10^{-6}$	557,71

5.5.2.2. Sélénométhionine :

La cinétique a été étudiée chez les rats (75) en utilisant du Se^{75} sélénométhionine et en établissant une circulation extra-carotidienne par l'intermédiaire d'un cathéter reliant les deux extrémités cardiaque et céphalique de la carotide gauche. A ce niveau, la radioactivité du sang a été mesurée en continu pendant les quelques heures qui ont suivi l'administration du produit marqué par voie intra-veineuse (activité spécifique : 140 mCi/mg).

La disparition de la radioactivité dans le sang répond à l'équation :

$$Y = 12 \text{ ex}(-1,5 t) + 5 \text{ ex}(-13 t) + 2 \text{ ex}(-34 t)$$

où Y est la radioactivité et t le temps exprimé en heures.

La disparition de la radioactivité du sang est rapide ; 10 minutes après l'injection, 5 % de la radioactivité totale injectée est retrouvée seulement.

5.5.3. - Distribution :

5.5.3.1. Teneurs normales chez l'homme :

5.5.3.1.1. - SANG :

Le tableau suivant donne les teneurs retrouvées par différents auteurs :

AUTEUR	MILIEU	TENEURS
BOWEN et CAWSE (1963)	Sang total	0,32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (38)
DICKSON et TOMLINSON (1967)	Globules rouges Plasma	0,24 $\pm$ 0,06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 0,14 $\pm$ 0,03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (93)
BURK (1967)	Sang total	0,22 $\pm$ 0,02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (47)
ALLAWAY (1968)	Sang total	0,21 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (12)
Mc CONNELL (1975)	Sérum	0,118 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (245)

5.5.3.1.2. - ORGANES :

Mc CONNELL (245) a évalué les teneurs en sélénium des différents organes chez l'homme, et a donné les résultats en μg par gramme de matière sèche :

Pancréas.....	$0,63 \pm 0,07$
Foie.....	$1,73 \pm 0,24$
Membrane synoviale.....	$0,63 \pm 0,12$

D'autres tentatives, en vue de déterminer les teneurs moyennes en sélénium de différents tissus, ont été réalisées par DICKSON et TOMLINSON (93), puis par ERMAKOV (109) en U.R.S.S., en 1965. Les résultats diffèrent énormément d'un individu à un autre, et aucune valeur moyenne ne peut être retenue.

5.5.3.2. Etude expérimentale chez l'animal :

Plusieurs facteurs interviennent dans l'interprétation des résultats :

5.5.3.2.1. - LA NATURE DU DERIVE :

L'autoradiographie d'une souris ayant reçu une injection de sélénite de sodium marqué par voie intra-veineuse (194) montre que la rétention du sélénium se fait principalement au niveau du foie, des reins et de la rate. Les mêmes résultats ont été observés avec le séléniat de sodium chez les brebis (308). Lorsque le sélénium est administré sous forme de sélénométhionine, la rétention au niveau du pancréas, de l'intestin grêle et de l'estomac, est aussi importante (161).

5.5.3.2.2. - L'ETAT GENERAL :

5.5.3.2.2.1. Le taux de croissance :

Du sélénite marqué a été administré par voie intra-veineuse à deux lots d'agneaux différant entre eux par leur taux de croissance, et provenant d'un troupeau souffrant d'une carence en cet élément. Deux heures après l'administration intra-veineuse, les reins et les glandes pituitaires des agneaux à croissance normale avaient des teneurs en sélénium beaucoup plus élevées que ceux qui provenaient des agneaux à croissance retardée. Les taux du sélénium au niveau des muscles, du foie et du pancréas, étaient cependant identiques dans les deux groupes. Ces résultats, selon les auteurs, montrent que les agneaux à croissance retardée ne sont pas aussi capables d'utiliser le sélénium au niveau des reins que les agneaux à croissance normale (451).

5.5.3.2.2.2. L'atteinte hépatique :

Les organes et les tissus des porcelets en bonne santé retiennent plus de sélénium que ceux des porcelets atteints d'une dystrophie hépatique. Dans les deux cas, la rétention la plus élevée est observée au niveau des reins, suivis par le foie et la rate, après une injection intramusculaire de Se^{75} sélénite de sodium (215).

5.5.3.2.3. - LA QUANTITE DE SELENIUM ADMINISTREE :

La distribution et l'élimination du sélénium chez les moutons recevant des doses croissantes de sélénium pendant 44 à 116 jours ont été étudiées par ROSENFELD et BEATH (339). Les animaux étaient groupés en 4 lots : 1 lot témoin et 3 autres lots recevant chacun une ration alimentaire plus ou moins riche en protéines : 20 %, 12 % et 1,5 %, respectivement. Les moutons nourris avec du sélénium organique (extrait d'Atriplex canescens) et minéral (sélénite de sodium) jusqu'à la mort éliminaient de petites quantités de sélénium dans les urines, ce qui montre une déficience rénale et une rétention tissulaire.

La rétention du sélénium dépend du taux de sélénium administré. Le foie et les reins ont les teneurs les plus élevées, alors que le cerveau et les muscles montrent les teneurs les plus basses, quelles que soient la proportion des protéines et la quantité de sélénium administrée. Dans les autres organes, les teneurs variaient en fonction de la quantité totale en sélénium ; le tissu adipeux n'emma-gasine pas, quelle que soit la quantité ingérée.

JACOBSSON (193) a étudié la rétention tissulaire à la suite de l'administration d'une seule dose de sélénite de sodium, sélénométhionine et sélélocystine, respectivement. La rétention tissulaire a lieu au niveau du cortex rénal, du foie et de la cortico-surrénale, et est beaucoup plus marquée pour les faibles doses que pour les doses élevées. Cela est dû à une limite de la capacité de stockage du sélénium chez les moutons.

ROQUEBERT et VITTE (337) ont repris les mêmes expériences sur les lapins, et ont abouti aux résultats suivants :

- Dans le cas d'une intoxication aiguë par le sélénite de sodium, le toxique se localise principalement dans le foie (10-14 %), les reins et les poumons. Ces deux derniers sont les organes les plus importants de l'élimination. La teneur du sang, relativement élevée les premiers jours, décroît rapidement.
- Dans le cas d'une intoxication chronique, on retrouve de fortes quantités de sélénium dans le foie, les reins et la rate, mais les poumons en contiennent beaucoup moins que dans le cas précédent. Il est intéressant de noter la présence du sélénium dans les poils des animaux soumis à une intoxication prolongée.

5.5.3.2.4. - LA VOIE D'ADMINISTRATION :

L'influence de la voie d'administration sur la rétention du sélénium par les différents organes a été étudiée par LOPEZ et son équipe (241) sur les brebis. La rétention est plus importante lors de l'administration du sélénite de sodium radioactif par voie intra-veineuse que par voie orale. Ceci est relativement d'autant plus important que les brebis sont nourries par rations de plus faible teneur en sélénium.

5.5.3.2.5. - LA TENEUR EN SELENIUM DE LA RATION ALIMENTAIRE :

La présence du sélénium dans la nourriture a un effet important sur l'absorption et la rétention de cet élément (197). En effet, 50 % de la dose administrée par voie orale est retenue par les poussins qui présentent une carence en sélénium, alors que 20 % seulement de la même dose est retenue par les poussins recevant une nourriture enrichie en sélénium (1 ppm). Les teneurs en sélénium des organes des poussins nourris par rations exemptes de sélénium étaient supérieures à celles des organes du deuxième groupe.

Lorsque l'apport quotidien en sélénium est faible, ce dernier, à la suite de son administration, se concentre dans les tissus capables d'utiliser le sélénium minéral pour en synthétiser les différents dérivés organiques. Ces dérivés seront distribués ultérieurement dans le reste des organes.

119 jours après l'administration par voie sous-cutanée de sélénite de sodium radioactif, MUTH (278), en 1967, a retrouvé plus de sélénium radioactif dans les tissus des moutons recevant une ration contenant 0,1 ppm de sélénium que dans ceux des moutons nourris par rations contenant 0,26 ppm.

Ces résultats sont en accord avec ceux observés par WRIGHT et BELL en 1964 (454), 48 heures après l'administration du sélénium marqué : la distribution du sélénium dans les différents tissus des brebis nourries par rations contenant 0,01 ppm de sélénium a été déterminée 48 heures après l'administration par voie orale d'une dose unique de 6 µg de sélénium sous forme de sélénite de sodium (454). Deux autres lots ont reçu la même ration alimentaire, à laquelle ont été ajoutés séparément du sélénium à 0,5 ppm et de l'alpha-tocophérol à 100 U.I. par jour. Un quatrième lot a reçu les deux à la fois.

A l'examen, les reins avaient les teneurs les plus élevées, suivis par le foie, la rate et le plasma. Les teneurs des reins et de la rate en Se^{75} des brebis auxquelles ils ont administré les rations contenant 0,01 ppm de sélénium uniquement étaient 2 à 3 fois plus importantes que celles retrouvées dans les mêmes organes des brebis ayant reçu une nourriture enrichie en sélénium. Les teneurs du sang et du plasma étaient aussi plus élevées. Par contre, la concentration en sélénium de certains muscles était plus élevée chez les derniers.

Dans le foie, les poumons et le coeur, les taux ne variaient pas en fonction de la teneur en sélénium dans la nourriture.

L'alpha-tocophérol n'a aucun effet sur la rétention du sélénium dans tous les organes.

HOPKINS et son équipe (184) ont repris les expériences sur les rats. Ils ont démontré que les rats nourris par rations de faible teneur en sélénium montrent une rétention plus importante au niveau des reins, 24 heures après l'administration par voie intra-péritonéale d'une seule dose de sélénite de sodium radioactif, que les rats auxquels ils ont administré des rations enrichies en cet élément (0,1, 1 et 5 ppm, respectivement). Les teneurs du foie n'étaient pas cependant affectées.

BURK et son équipe (46), en 1972, ont repris ces expériences sur 6 lots de rats. Un lot témoin a été nourri par rations exemptes de sélénium, 5 autres lots ont reçu des rations plus ou moins enrichies en cet élément : 2 lots à 0,1 ppm, puis un lot à 0,25, 0,50 et 1 ppm, respectivement. 35 jours après, les rats ont reçu par voie intra-péritonéale une dose de 1 μ Ci de Se^{75} sous forme de sélénite de sodium. Le lot témoin a été partagé en 3 groupes qui ont reçu, en même temps que le sélénite marqué, 20, 50 et 200 μ g de sélénite de sodium froid, respectivement. La radioactivité totale a été déterminée à des intervalles de temps différents, commençant 5 minutes après l'administration du sélénium radioactif, et pour une durée totale de 35 jours au bout de laquelle les rats ont été sacrifiés, leurs organes prélevés et la radioactivité correspondante comptée.

Les résultats montrent qu'à toute augmentation de la teneur en sélénium dans la nourriture, correspond une baisse de la rétention totale. Les testicules, le cerveau, la rate, les reins, l'intestin grêle, contiennent les plus fortes teneurs. Ces dernières diminuent lorsque la teneur en sélénium dans la nourriture augmente; les teneurs des muscles striés et du foie varient dans le sens opposé.

Le foie provenant des rats ayant reçu la ration exempte de sélénium avait la teneur la plus faible en sélénium parmi tous les organes analysés. Une teneur de 0,1 ppm en sélénium dans la nourriture fait quadrupler la concentration du sélénium à ce niveau, mais cette dernière diminue à toute augmentation ultérieure.

Ces résultats sont en accord avec ceux observés par EWAN et son équipe (111) : la rétention d'une seule dose de sélénium administrée est inversement proportionnelle à la teneur du sélénium de la nourriture.

5.5.3.2.6. - LE TEMPS AU BOUT DUQUEL LA RADIOACTIVITE EST COMPTEE :

WRIGHT (450), en 1965, a étudié la variation de la radioactivité, donc la rétention, des différents organes à la suite de l'administration d'une dose unique de Se^{75} sélénite de sodium par voie intra-veineuse au mouton. Il a évalué le rapport : activité de l'organe X.
activité du sang

Pendant les 28 jours qui ont suivi l'injection, le rapport rein/sang a baissé régulièrement, alors que ceux des autres organes, y compris le foie et les muscles, n'ont cessé d'augmenter. 12 % de la radioactivité totale a été éliminée par les reins, et 10 % par les fèces.

5.5.3.2.7. - LE SEXE :

Il s'agit des travaux de PARIZEK et de son équipe (302) qui ont démontré que la rétention rénale du triméthyl-sélénium est rapide. Dans les quelques minutes qui suivent l'administration par voie intra-veineuse du Se^{75} triméthyl-sélénium à des rats adultes mâles et femelles, plus de 20 % de la radioactivité totale administrée est localisée au niveau des reins. Quelques heures après, la teneur en Se^{75} triméthyl-sélénium au niveau des reins, chez les rats mâles, est beaucoup plus importante que celle obtenue chez les rats femelles. PARIZEK a démontré que la rétention du triméthyl-sélénium est liée étroitement à la présence de stéroïdes androgènes et/ou anabolisants.

A la suite de l'administration de Se^{75} sélénométhionine par voie intra-veineuse aux poussins, VOHRA (429) a rapporté, pour un même organe, une différence importante concernant les teneurs en sélénium en fonction du sexe.

5.5.3.3. Distribution intracellulaire :

La distribution intracellulaire du Se^{75} sélénite de sodium au niveau du foie et des reins est caractéristique de chacun de ces deux organes (454). Plus de 75 % de la radioactivité totale hépatique se retrouve au niveau de la fraction nucléaire, le reste de la radioactivité est réparti d'une façon homogène et bien régulière entre les particules et le surnageant hépatique. D'après Mc CONNELL et ROTH (250), la radioactivité liée aux microsomes hépatiques et mesurée après administration de Se^{75} acide sélénieux aux brebis ayant reçu des rations pauvres en sélénium est plus élevée que celle retrouvée dans les mêmes microsomes provenant des brebis auxquelles on administre une ration enrichie en cet élément. Cette augmentation de la radioactivité microsomale se fait aux dépens de celle des autres composants cellulaires et devient l'indice d'une meilleure incorporation du sélénium par les microsomes hépatiques dans les protéines.

Les variations de la distribution intracellulaire au niveau des reins sont moins marquées. Cependant, on note que la fraction nucléaire provenant de brebis recevant une nourriture de faible teneur en sélénium contient plus de radioactivité que la fraction correspondante provenant de brebis nourries par rations enrichies en cet élément. Parallèlement à cette augmentation, on note une baisse de la radioactivité mitochondriale et de la radioactivité du surnageant rénal.

Ces mêmes observations, mais dans le sens opposé, ont été faites chez les poussins ayant reçu des teneurs toxiques en sélénium (456).

HANSSON et JACOBSSON (161) ont étudié la distribution et la rétention de la sélénométhionine à la suite de l'administration aux rats par voie intra-veineuse du dérivé marqué au Se^{75} , dans différents organes à partir desquels ils ont préparé des homogénats : foie, reins, intestins et cerveau. Dans les 5 minutes qui ont suivi l'administration, la radioactivité a été localisée principalement dans la fraction non protéique. Plus tard, la majorité de cette radioactivité était liée aux protéines. La sélénométhionine, lors de son incorporation dans les protéines, suit la même voie que les acides aminés.

Deux heures après l'administration de Se^{75} sélénométhionine par voie intra-veineuse aux poussins, VOHRA et son équipe (429) ont retrouvé 83 % de la radioactivité totale au niveau du foie, liée à la fraction protéique.

En 1972, MILLAR et son équipe (264) ont étudié la distribution du sélénium dans les différentes protéines des surnageants hépatique et rénal. Ils ont effectué leurs travaux sur 4 lots de rats : le premier lot a reçu une nourriture de faible teneur en sélénium, le deuxième une nourriture enrichie en vitamine E, le troisième enrichie en sélénium, et le quatrième enrichie en sélénium et en vitamine E.

Les constituants des surnageants hépatiques ont été séparés sur une colonne de Sephadex G-150 (40-120 μ). La séparation a donné deux pics principaux et deux autres secondaires. Les poids moléculaires des deux pics fondamentaux sont de 280.000 et 100.000, respectivement.

Chez les rats qui ont reçu une nourriture de faible teneur en sélénium, au premier pic, correspondaient 20 % de la radioactivité totale liée aux protéines du surnageant hépatique, le deuxième représentait 70 % de cette même radioactivité.

Les deux pics provenant des deux lots qui ont reçu une nourriture enrichie en cet élément représentaient, chacun, 40 % de la radioactivité totale.

L'éluat correspondant au premier pic, dans tous les cas, repassé sur une colonne de gel Sephadex G 150, donnait naissance à trois pics secondaires, dont un seul absorbait à 280 nm. Les deux autres seraient présents en quantité infiniment faible, de sorte qu'ils n'absorbent pas à cette même longueur d'onde (264).

En ce qui concerne les reins, on retrouve les deux pics principaux et les deux autres secondaires. Cependant, la chromatographie de l'éluat correspondant au premier pic

sur une colonne de Sephadex G 150 n'aboutit pas aux mêmes résultats ; un seul pic a été retrouvé. D'autre part, la distribution de la radioactivité n'est pas liée au régime alimentaire en sélénium.

- CONCLUSION :

Après injection d'une seule dose de Se^{75} sélénite de sodium, les protéines du surnageant hépatique, chez les rats nourris par rations enrichies en sélénium, contiennent plus de radioactivité que les protéines du même surnageant provenant de rats nourris par rations de faibles teneurs en sélénium. Au niveau des reins, cette différence n'a pas lieu.

Alors que la rétention globale du sélénium pour les reins est largement influencée par la teneur en sélénium de la nourriture, la rétention globale hépatique semble l'être beaucoup moins. Ceci implique l'existence de voies métaboliques différentes au niveau de ces deux organes.

L'augmentation de la rétention du sélénium par les protéines du surnageant hépatique provenant de rats nourris par rations enrichies en cet élément peut être expliquée de plusieurs manières :

- simple échange du Se^{75} radioactif avec le sélénium froid ;
- présence au niveau des protéines, chez les rats nourris par rations enrichies en sélénium, d'un nombre plus important de sites actifs fixant le sélénium ;
- modification de la structure des protéines.

La deuxième explication semble être plus évidente. En effet, SCHWARTZ (362) a rapporté l'existence d'une dépression respiratoire associée à une carence simultanée en vitamine E et en sélénium, et accompagnée d'une baisse de 40 % du taux de groupements sulphydryls SH libres titrables.

5.5.4. - Elimination :

5.5.4.1. Eliminations urinaire, pulmonaire et fécale :

5.5.4.1.1. - TENEURS NORMALES DANS LES URINES.
CONCENTRATION MAXIMALE ADMISSIBLE CHEZ
L'HOMME. TENEURS RETROUVEES CHEZ LES
OUVRIERS EXPOSES :

5.5.4.1.1.1. Teneurs normales :

Pour les premières observations, il était difficile d'estimer la teneur moyenne en sélénium des différents échantillons analysés, les méthodes utilisées n'étaient pas suffisamment sensibles pour permettre le dosage et la détection du sélénium existant à l'état de traces.

Ainsi, DUDLEY (99), en 1936, qui a analysé les urines des ouvriers travaillant dans l'affinage du cuivre, en a conclu que le sélénium existait dans ces urines à l'état de traces non détectables et que la valeur la plus élevée observée était de 0,069 mg/litre, valeur très voisine de la limite de détection. A la suite de l'analyse des urines d'individus normaux non exposés, il en a conclu que, dans leurs urines, le sélénium ne doit pas exister à une teneur appréciable.

Plus tard, SMITH et WESTFALL (395) ont énuméré les résultats d'une enquête réalisée sur 127 individus appartenant à 90 familles demeurant dans des régions sélénifères des Etats de Wyoming, Dakota du Sud et Nebraska, aux Etats-Unis. 89 % des individus présentaient des teneurs en sélénium dans leurs urines, variant entre 0,02 et 0,99 mg/litre, 3 % des teneurs urinaires dépassaient la valeur de 0,1 mg/litre.

STERNER et LIDFELT (405) ont déterminé les teneurs en sélénium des urines de 79 individus vivant à New York. Ils ont trouvé une moyenne de 0,048 mg/litre, les teneurs variaient de 0,00 à 0,15 mg/litre.

WILLIAMS et son équipe (448) ont rapporté les résultats observés dans 19 échantillons d'urine provenant de personnes non exposées résidant à Washington. Les valeurs variaient de 0,002 à 0,07 mg/litre, mais aucune ne dépassait 0,1 mg/litre.

Enfin, GLOVER (134), en 1967, a rapporté les valeurs observées entre les années 1956 et 1958, chez les individus se présentant à l'examen de préembauche : 793 analyses ont été réalisées. La teneur moyenne a été de 0,034 mg/litre et peut être considérée comme étant la valeur moyenne chez la population britannique non exposée à cet élément.

5.5.4.1.1.2. Teneurs trouvées chez les ouvriers exposés :

GLOVER (134) a étudié aussi l'évolution de la teneur en sélénium des urines chez les ouvriers exposés pendant la période qui s'est écoulée entre les années 1954 et 1958. Pour les 1.517 analyses effectuées, il a obtenu une moyenne de 0,084 mg/litre. Il a réparti les ouvriers en groupes, en fonction du travail manipulé. La moyenne la plus élevée a été observée chez les ouvriers travaillant dans le meulage avec une moyenne de 0,336 mg/litre, alors que les moyennes les plus faibles étaient de 0,051 et 0,061 mg/litre, observées dans les ateliers de pulvérisation et chez le personnel de contrôle, respectivement.

En 1958, seuls les ouvriers travaillant dans le meulage et le recuit du verre présentaient encore dans leurs urines des valeurs supérieures à 0,1 mg/litre, et cela à la suite des mesures prophylactiques prises.

Durant ces quatre années, plusieurs observations concernant l'élimination urinaire du sélénium ont été réalisées par GLOVER :

- 1) La valeur la plus élevée observée était de 4,9 mg/litre chez un ouvrier travaillant dans l'affinage des métaux. Il s'agit d'un accident du travail : en effet, l'ouvrier en question a inhalé de la poussière de sélénium qui s'est échappée d'un conduit de ventilation lors de son nettoyage. La poussière contenait aussi bien du dioxyde de sélénium que du sélénium élémentaire. Cependant, aucun signe de dyspnée n'a été rapporté, l'hospitalisation n'a pas été nécessaire.
- 2) L'élimination urinaire du sélénium variait chez les ouvriers exposés, et cela d'une manière périodique. Elle passait par un maximum à la fin de chaque semaine (jeudi, vendredi et samedi) pour diminuer ensuite. Cette variation n'a pas lieu dans la population normale.
- 3) Chez les ouvriers exposés à de fortes concentrations de sélénium, les teneurs urinaires diminuaient vite à la suite de l'arrêt du travail. Une semaine après, la teneur ne dépassait guère la concentration maximale admissible.

5.5.4.1.1.3. Concentration maximale admissible :

Plusieurs facteurs ont obligé les hygiénistes et les responsables des services de la Santé publique dans le monde à définir pour le sélénium une concentration maximale admissible dans les urines. L'un de ces facteurs est la présence de régions hautement sélénifères. C'est l'exemple des Etats de Wyoming, Dakota du Sud et Nebraska aux Etats-Unis, où la population éliminait des quantités appréciables de cet élément dans l'urine à la suite de son exposition au sélénium véhiculé par l'eau, les végétaux, les légumes et les produits laitiers. En 1963, HADJIMARKOS (146) a démontré l'existence d'une corrélation étroite entre l'apparition de caries dentaires chez les enfants et leur exposition à des teneurs assez élevées en cet élément.

En 1950, ELKINS (107) a établi que l'élimination urinaire du sélénium ne doit pas dépasser 0,4 mg/litre, valeur retenue dès lors comme la concentration maximale admissible.

En 1960, TANK et STORVICK (410) ont énoncé que l'élimination urinaire du sélénium, aussi bien par les individus exposés ou non, ne doit pas dépasser la valeur de 0,1 mg/litre.

GLOVER (134), en 1967, a réaffirmé ces dernières observations.

5.5.4.1.2. - ETUDE EXPERIMENTALE CHEZ L'ANIMAL :

Les mêmes facteurs qui influencent le taux de distribution et de rétention du sélénium dans les différents tissus et organes influencent aussi son élimination. Cependant, on se limitera ici aux principaux travaux qui ont été réalisés dans ce domaine.

5.5.4.1.2.1. Le taux de sélénium administré :

ROQUEBERT et VITTE (337), lors de leurs travaux sur les lapins, sont arrivés aux résultats suivants :

- Dans le cas d'une intoxication aiguë avec du sélénite de sodium, le sélénium est activement et rapidement éliminé par voie pulmonaire, les animaux présentent, en effet, une haleine d'odeur alliagée caractéristique. Il est aussi éliminé par les reins : la quantité excrétée dans l'urine pendant la période de survie varie entre 5 et 15 % de la totalité injectée, l'élimination étant d'autant plus importante que la durée de survie est plus longue.
- Dans le cas d'une intoxication chronique, la voie urinaire, quelle que soit la voie d'administration, est toujours la plus importante : 50 % en moyenne des doses administrées quotidiennement passent dans l'urine. L'élimination fécale, plus élevée lorsque l'administration se fait par voie orale que par injection, représente une moyenne de 18 à 22 % de la quantité administrée par jour. Lors de l'arrêt du traitement après intoxication chronique, l'élimination est rapide durant les premiers jours, mais on continue à trouver du sélénium dans les excréta pendant un mois.

Mc CONNELL et ROTH (252) ont étudié l'élimination du sélénium par les deux voies, urinaire et pulmonaire, en fonction de la dose administrée chez le rat. Le sélénium a été administré sous deux formes : sélénite de sodium et séléénométhionine. Lorsqu'une faible dose de sélénium a été injectée, 0,005 mg de sélénium/kg sous forme de sélénite et 0,001 mg de sélénium/kg sous forme de séléénométhionine, 1 % de la radioactivité totale administrée a été éliminée par voie pulmonaire. Par contre, lorsque des doses élevées de sélénium ont été administrées par la même voie, 5,4 mg de sélénium/kg sous forme de sélénite et 5,6 de sélénium/kg sous forme de séléénométhionine, plus de 50 % et plus de 35 % de la dose injectée, respectivement, ont été éliminées par la voie pulmonaire, 70 % de la radioactivité totale éliminée dans les 24 heures qui suivent l'injection ont été excrétés les 6 premières heures.

Ces résultats s'accordent bien avec ceux obtenus par HIROOKA et GALAMBOS (181). Lorsque la dose administrée de sélénium sous forme de sélénite ou de séléniate de sodium passe de 1,4 à 0,08 mg/kg chez le rat, l'élimination pulmonaire diminue énormément pour être considérée comme négligeable.

5.5.4.1.2.2. La nature du dérivé :

Mc CONNELL et ROTH (252) ont réalisé une comparaison entre l'élimination par voie pulmonaire du sélénium administré sous forme de sélénite de sodium et l'élimination, par la même voie, de la sélénométhionine. L'élimination du sélénite de sodium par cette voie excède de 5 à 25 % celle de la sélénométhionine à doses élevées. Cependant, aux faibles doses, cette différence n'a pas lieu. Lorsque les doses sont élevées, on note que, parallèlement à l'augmentation de l'excrétion pulmonaire, il y a une chute importante de l'élimination par voie urinaire, aussi bien du sélénite que de la sélénométhionine.

HIROOKA et GALAMBOS (181) ont démontré que l'élimination urinaire du sélénium chez le rat, à la suite d'une seule injection de Se^{75} séléniat de sodium, est plus faible que dans le cas du Se^{75} sélénite de sodium.

5.5.4.1.2.3. La voie d'administration et la teneur en sélénium de la ration alimentaire :

LOPEZ et son équipe (241) ont effectué leurs travaux sur 5 lots de brebis : un lot témoin nourri par rations exemptes de sélénium et 4 autres lots nourris par rations différentes, toutes enrichies en sélénium, 0,01, 0,26, 0,51 et 5,01 ppm, respectivement. Ils ont constaté que, chez les brebis ayant reçu une nourriture de faible teneur en sélénium (0,01 ppm), à la suite de l'administration par voie orale d'une dose unique de Se^{75} sélénite de sodium, l'élimination pulmonaire était légèrement plus faible que l'élimination fécale*. Ceci était inversé chez les brebis nourries par rations à teneurs beaucoup plus élevées en sélénium : 5,01 ppm ; l'élimination pulmonaire, dans ce cas, était plus faible que les éliminations urinaire et fécale. Cette dernière était plus importante que l'élimination urinaire chez les brebis nourries par rations dont les teneurs en sélénium étaient de 0,01 et 0,26 ppm, respectivement. Là aussi, le rapport était inversé lorsque les teneurs en sélénium des rations administrées sont passées de 0,51 à 5,01 ppm.

Lorsque l'administration du sélénite radioactif a eu lieu par voie intra-veineuse, LOPEZ a constaté que l'élimination pulmonaire était plus importante que l'élimination fécale, mais plus faible que l'élimination urinaire.

L'élimination par voies pulmonaire et urinaire augmente avec la teneur en sélénium de la nourriture. La voie d'administration est le principal facteur qui affecte le taux d'élimination fécale.

HOPKINS et son équipe (184) ont repris les expériences sur les rats. Ils ont démontré que l'excrétion urinaire du sélénium chez les rats augmente parallèlement à la teneur en sélénium de la ration alimentaire. Alors que cette

* Elle est néanmoins plus importante que l'élimination urinaire.

excrétion ne représentait que 10 à 20 % de la totalité injectée 24 heures après administration chez les rats ayant reçu la ration de faible teneur en sélénium, elle est passée à 47 % pour une teneur de 5 ppm en sélénium. Par contre, l'excrétion urinaire ne semble pas varier énormément avec la quantité injectée pour une marge assez grande.

BURK et son équipe (46), dont les travaux ont été déjà cités, ont démontré que, parallèlement à l'augmentation de la teneur en sélénium de la nourriture, on note une diminution de la rétention et une augmentation de l'excrétion urinaire. L'élimination fécale est toujours la même et ne varie pas.

L'élimination urinaire, à la suite d'une injection d'une dose unique de sélénite de sodium, est directement proportionnelle à la teneur en sélénium dans la nourriture tant que celle-ci ne dépasse pas 1 ppm (46). Les travaux ultérieurs de BURK et de son équipe (48), en 1973, ont permis de vérifier ces résultats obtenus et de définir une teneur limite à partir de laquelle cette proportionnalité est observée. Cette teneur limite serait comprise entre 0,054 et 0,084 ppm.

5.5.4.1.3. - FORMES D'ELIMINATION DU SELENIUM. METHODES D'IDENTIFICATION :

5.5.4.1.3.1. Excrétion pulmonaire :

C'est HOFMEISTER qui a pensé, en 1893, que le sélénium s'éliminait, après méthylation, par voie pulmonaire sous forme de diméthyl-sélénium, responsable de l'odeur alliagée de l'haleine des sujets intoxiqués par cet élément.

Cette idée, bien que contestée par quelques chercheurs, a été néanmoins reprise par plusieurs auteurs et acceptée comme établie.

C'est KENNETH Mc CONNELL et PORTMAN (249), qui ont identifié et dosé, en 1952, le diméthyl-sélénium en faisant passer l'air expiré par l'animal dans une solution saturée de chlorure mercurique. Il se forme un composé $(CH_3)_2 Se, HgCl_2$ qui précipite. Ils ont observé que le diméthyl-sélénium, après injection sous-cutanée chez le rat, était éliminé dans l'air expiré : 15 à 20 % du produit étaient éliminés dans les deux minutes qui suivent l'injection ; 70 à 80 % étaient éliminés à la sixième heure.

5.5.4.1.3.2. L'élimination urinaire :

BYARD (54) a montré que le triméthyl-sélénium est un métabolite de détoxication urinaire du sélénium. Dans le même temps, PALMER et son équipe (300) ont identifié l'ion triméthyl sélénonium $Se^+-(CH_3)_3$ (TMSe) comme produit majeur d'excrétion du sélénium dans les urines du rat.

PALMER (301) a repris cette étude en administrant plusieurs dérivés de sélénium aux rats, et a examiné par chromatographie bidimensionnelle sur papier les métabolites excrétés dans les urines. Deux mélanges de solvants ont été utilisés, un pour chaque migration :

- 1) Phénol - eau (70 : 30 p.p.)
- 2) Butanol - acide acétique - eau (4 : 1 : 1 v. v. v)

Il a démontré que le triméthyl-sélénium est un produit d'excrétion majeur des séléniates, de la sélénométhionine, de la sélénocystine, du Se-méthyl-sélénocystéine et du blé sélénifère. Les taux du TMS₂Se dans les urines variaient de 20 à 50 % du sélénium total, selon le produit administré et la durée de recueil des urines.

Un deuxième métabolite majeur non identifié est excrété à partir de chaque dérivé de sélénium radioactif et totalise 11 à 28 % du sélénium global de l'urine. Ce deuxième métabolite, appelé U₂, serait aussi important après les 12 premières heures qui suivent l'administration que le triméthyl-sélénium, du moins pour les dérivés inorganiques. Ceci montre, selon l'auteur, que les mécanismes de métabolisme du sélénium sont similaires quel que soit le dérivé administré.

KIKER et BURK (207) ont repris l'étude sur deux lots de rats : un lot nourri par rations de faible teneur en sélénium, 0,006 ppm, et un deuxième lot recevant une nourriture supplémentée de 0,5 ppm en sélénium à l'état de sélénite. Au début du traitement, le poids moyen des rats était de 80 g, et est passé à 300 g à la fin de la durée du traitement. 3 jours avant l'administration par voie intra-veineuse de 0,37 µg/kg (20 µCi) de sélénite de sodium radioactif, l'eau a été remplacée par une solution de sucrose pour augmenter le volume urinaire. L'urine a été recueillie par l'intermédiaire d'un cathéter introduit dans l'uretère, 10 minutes après l'injection et pendant les 6 heures qui ont suivi. L'analyse de l'urine par chromatographie bidimensionnelle sur papier, suivant la méthode de PALMER, a permis de séparer 4 spots différents détectés par autoradiographie et correspondant à 4 métabolites organiques.

METABOLITES	R.F.
U ₁	0,90 - 0,40
U ₂	0,88 - 0,61
U ₃	0,84 - 0,11
U ₄	0,51 - 0,13

L'excrétion urinaire du sélénium sous la forme inorganique s'effectue principalement pendant les dix premières minutes, et représente alors 85 % de la radioactivité totale de l'urine excrétée par les rats des deux lots. Ce

temps dépassé, le sélénium à l'état inorganique ne représente guère que 50 % de la radioactivité globale éliminée dans les urines des rats nourris par rations de faible teneur, et 20 % seulement chez les rats recevant la nourriture supplémentée en sélénium.

Le TMSe et le U_2 ne représentent chacun que 10 % de la radioactivité globale éliminée dans les urines pendant les dix premières minutes. La proportion augmente ensuite régulièrement pour atteindre 90 minutes après un maximum stable pendant toute la durée de l'analyse (6 heures). Chez les rats nourris par rations de faible teneur en sélénium, le TMSe et l' U_2 représentent chacun 20 % de l'excrétion totale, alors que chez le deuxième lot de rats, le TMSe et l' U_2 représentent respectivement 30 à 40 %, et 30 % de l'élimination globale.

L'excrétion de l' U_3 et de l' U_4 ne varie pas avec la teneur en sélénium de la ration alimentaire. Leur taux d'excrétion est stable pendant toute la durée de l'analyse et représente pour chacun 5 % de l'élimination globale.

L'élimination globale urinaire baisse régulièrement à la suite de l'injection (10 minutes après) pour atteindre un minimum 40 minutes après. Elle augmente ensuite pour atteindre un niveau assez stable 90 minutes après l'administration. Cette augmentation est liée à l'apparition des métabolites organiques.

L'excrétion massive du sélénium radioactif inorganique, pendant les dix premières minutes qui suivent son administration, est due à la filtration glomérulaire qui précède sa fixation par les différents tissus.

L'augmentation de l'élimination urinaire du sélénium qui suit l'augmentation de sa teneur dans la nourriture est due principalement à la production des différents métabolites organiques.

5.5.4.2. Sécrétions glandulaires :

5.5.4.2.1. - LE LAIT :

5.5.4.2.1.1. Teneurs normales dans le lait d'origine humaine :

HADJIMARKOS (146) a déterminé la teneur moyenne en sélénium dans le lait maternel, la valeur trouvée est de 0,021 ppm.

5.5.4.2.1.2. Forme sous laquelle le sélénium est retrouvé :

Le passage du sélénium dans le lait a été démontré pour la première fois par Mc CONNELL et ROTH chez le chien (251) à la suite de l'administration du sélénium sous forme d'acide sélénieux radioactif par voie sous-cutanée. De la

radioactivité a été détectée dans le lait, la quasi totalité était liée aux protéines et était partagée d'une manière égale entre, d'une part, la caséine et, d'autre part, les protéines sériques du lait.

Chez les bovins, MATHIAS (261) a retrouvé que 60 % du sélénium étaient liés à la caséine et que le taux éliminé dans le lait à la suite de l'administration de la nourriture renfermant 1 ppm en sélénium était de 0,7 %.

GRANT et WILSON (141) ont étudié l'influence de la voie d'administration sur la teneur en sélénium du lait de vache. La concentration était beaucoup plus importante à la suite de l'administration de séléniolate de sodium par voie sous-cutanée que par voie orale.

5.5.4.2.2. - SECRETION BILIAIRE :

Du sélénium radioactif a été retrouvé dans la bile chez les chiens auxquels on avait administré du séléniolate de sodium par voie intra-péritonéale. Cette sécrétion biliaire du sélénium aurait une influence sur l'élimination de l'élément en question.

5.5.4.2.3. - SECRETION SALIVAIRE :

La sécrétion du sélénium dans la salive a été démontrée par CLAYCOMB et son équipe (72) à la suite de l'administration de Se^{75} séléniolate de sodium aux rats par voie intracardiaque. Le passage, dans ce cas, est rapide : l'apparition du sélénium a lieu dans les heures qui suivent l'injection.

6. APPLICATIONS

6.1. APPLICATIONS INDUSTRIELLES -

6.1.1. - Industries électrique et électronique :

Les industries électrique et électronique sont devenues les principales utilisatrices de sélénium ; 99 % du sélénium qu'elles emploient sont incorporés aux redresseurs secs à plaques, et le reste aux cellules photo-électriques.

Les redresseurs se composent d'une plaque d'acier ou d'aluminium revêtue sur une face d'une couche de sélénium que l'on recouvre ensuite, par projection, d'une contre-électrode faite d'un alliage métallique à bas point de fusion. Cela permet au courant de passer dans un sens, mais oppose une grande résistance au retour du courant en sens inverse, si bien que l'on obtient un courant unidirectionnel ou que, en d'autres termes, le courant alternatif est redressé en courant continu.

L'effet photo-électrique de cet élément a été mis à profit en colorimétrie, photométrie et pyrométrie. Une cellule au sélénium est formée d'une mince couche de cet élément déposée sur une plaque translucide d'or ou d'un autre métal. La cellule commerciale utilisée en photographie est une cellule reliée à un galvanomètre. Actuellement, les cellules au sélénium ont un intérêt plus historique ou scientifique que commercial. Malgré leurs perfectionnements, l'inertie de ces cellules est un obstacle sérieux à leur emploi, on tend de plus en plus à les remplacer par des cellules à l'oxyde cuivreux.

Une autre application intéressante de la photosensibilité du sélénium est son emploi en xérographie.

6.1.2. - Industrie du verre et de la céramique :

- DECOLORANT :

L'industrie du verre emploie le sélénium pour décolorer le verre à bouteille de qualité médiocre et pour en faire le verre transparent brillant qui sert à la fabrication des bouteilles à lait et de la verrerie pour laboratoire. Il permet de faire disparaître la teinte verdâtre due à la présence de silicate ferreux.

- COLORANT :

L'incorporation du sélénium dans le verre donne des verres teintés. La température agit sur la couleur : le verre rouge est obtenu en chauffant entre 500 et 700°C du verre avec un mélange de cadmium (82-90 %) et de sélénium (18-10 %) ; selon les proportions, la gamme des teintes s'étend du jaune-rougeâtre au rouge foncé.

Les pigments obtenus par combinaison du sulfure de cadmium (jaune) avec le sélénium présentent l'avantage de pouvoir être portés à des températures plus élevées que les colorants organiques. Ces pigments ont servi, dans le temps, à la préparation de l'encre et de certains produits cosmétiques (43).

6.1.3. - Industrie métallurgique :

Le sélénium sert à la fabrication d'alliages. L'emploi des ferro-séléniures s'est développé depuis 1938 ; la teneur en sélénium de ces alliages est de 0,2 à 0,3 %. Comme le soufre, le sélénium confère aux aciers une plus grande résistance à la corrosion et permet de les travailler à chaud ou à froid avec de brusques variations de température. Le sélénium est un des constituants des trois variétés d'acier militaire

L'addition de sélénium au cuivre permet de faciliter le travail de cet élément. L'addition accroît également la résistance à la corrosion du plomb et des alliages du magnésium.

6.1.4. - Industrie du caoutchouc :

Le sélénium entre dans la fabrication du caoutchouc comme remplaçant du soufre dans l'opération de vulcanisation.

On exploite également ses propriétés anti-abrasives au cours de l'usinage de tuyaux de caoutchouc et de gaines de câbles.

6.2. APPLICATIONS THERAPEUTIQUES -

6.2.1. - Chez l'homme :

- CAS DU SULFURE DE SELENIUM :

En 1952, SLEPYAN (393) a proposé un shampooing à base de sulfure de sélénium pour le traitement de la séborrhée. Le sulfure de sélénium semble être actif contre le pityriasis versicolor (333, 417). Une suspension de sulfure de sélénium, de bentonite et de détergent, est commercialisée, à l'heure actuelle, sous le nom de "Selsun" et "Selsun bleue" ; une crème à base de sulfure de sélénium a été utilisée contre le Tinea versicolor (8, 231).

- CAS DU SELENIUM ELEMENTAIRE COLLOIDAL :

Il est utilisé sous forme d'hydrosol isotonicisé dans le traitement des mycoses palmo-dentaires et du "pied d'athlète", du pityriasis stéatoïde et versicolor (103). Mais l'efficacité est moindre que dans le cas du sulfure de sélénium,

on a noté plusieurs cas de rechutes ; parfois, il ne s'agit que d'un échec relatif puisque la reprise du traitement est suivie d'une guérison.

Il présente cependant l'avantage d'un emploi facile et d'une innocuité absolue, l'application est strictement indolore.

- CAS DES DERIVES ORGANO-SELENIES :

Certaines tentatives (122) ont été réalisées en vue de substituer le soufre par le sélénium dans certaines molécules organiques présentant des propriétés antibactériennes. Bien que les résultats obtenus aient été similaires, sinon meilleurs, à ceux obtenus avec les dérivés soufrés, l'usage en a été limité à cause de l'odeur désagréable.

- CAS D'UNE COMBINAISON SELENIUM - VITAMINE E :

Un médicament à base de sélénite de sodium et d'alpha-tocophérol a été proposé et testé au Mexique et aux Etats-Unis pour le traitement de l'angor. Les observations effectuées chez différentes espèces animales dans le traitement de l'arthrite ont été à l'origine de cette idée. Ceci a incité un laboratoire pharmaceutique américain à tester une formule de 0,5 mg de sélénite de sodium et de 100 U.I. de vitamine E sous forme de succinate d'alpha-tocophérol. Cette formule a été étudiée au départ chez le singe Rhesus pour une durée d'un an, pendant laquelle différents lots d'animaux ont reçu des doses croissantes de sélénium associées à la vitamine E.

Chez l'homme, l'étude a été réalisée sur des volontaires sains, en utilisant la méthode de "double aveugle" pour une durée de 18 semaines (122). Aucune toxicité n'a été observée.

RAMIREZ (426) a repris les études, cette fois-ci, sur 24 malades souffrant d'angor. Les résultats observés ont été les suivants : chez 22 des 24 malades, l'administration du sélénium alpha-tocophérol a réduit les douleurs de l'angine de poitrine, chez 5 patients, le placebo avait un effet similaire mais beaucoup moins accentué.

- SELENITE DE SODIUM :

Une équipe de chercheurs, aux Etats-Unis, a proposé récemment l'addition de sélénium, sous forme de sélénite de sodium, aux vaccins pour en augmenter l'efficacité.

Le sélénite de sodium a été utilisé dans le traitement de certaines maladies de dénutrition, dont le kwashiorkor.

6.2.2. - Chez l'animal :

Le sélénium a été utilisé dans l'engraissement du bétail et dans certaines maladies de carence à une teneur de 0,15 à 0,90 ppm dans la nourriture (198).

6.3. APPLICATIONS RADIOLOGIQUES -

6.3.1. - Se⁷⁵ triméthyl-sélénium :

Il s'agit d'un métabolite urinaire normal à partir du sélénium, aussi bien chez l'homme que chez les animaux. PARIZEK (302), à la suite des observations réalisées sur la rétention rénale de ce métabolite après une injection intraveineuse du dérivé radioactif, a proposé l'usage du TMS₂Se marqué au Se⁷⁵ ou au Se⁷² pour le dépistage du fonctionnement rénal et/ou du diagnostic endocrinien.

6.3.2. - Se⁷⁵ sélénométhionine :

La fixation tissulaire de la sélénométhionine est due probablement au fait que la méthionine entre dans la composition de nombreuses protéines et est, par conséquent, un bon indicateur de leur synthèse et de la multiplication cellulaire. Dans ce but, elle marque un processus métabolique de synthèse et non de sécrétion ou de détoxication (59), et elle ne fait pas appel aux modifications vasculaires observées dans le cas de cancer.

La sélénométhionine est employée dans le cas de cancers fixant le produit : parathyroïde (169, 321), thyroïde (414), lymphes (121), thymus (418), surrénales (262) et foie (59) ; le pancréas, par contre, ne fixe pas ce dérivé (76, 170).

6.4. APPLICATIONS PHYTOSANITAIRES -

Les dérivés du sélénium ont été utilisés comme insecticides pour le contrôle des aphides, mites, anguillules du chrysanthème et l'araignée rouge des oeillets et de certaines plantes ornementales. Il s'agit le plus souvent de solution de séléniate de sodium à 25 ppm et de solution ammoniacale de sélénosulfure de potassium à 30 % (Sélocide), utilisées soit en pulvérisation, soit par application directe au sol.

Vu la toxicité de ces produits aussi bien pour l'homme que pour les végétaux, l'usage a été déconseillé par DUDLEY en 1938 (100). Ces dérivés ne sont plus utilisés à l'heure actuelle.

7. TOXICOLOGIE DU SELENIUM ET DE SES DERIVES

7.1. INTOXICATION NATURELLE : VEGETAUX SELENIFERES -

Une intoxication, probablement par le sélénium, a été signalée pour la première fois par MARCO POLO en 1295, qui a décrit une plante poussant dans certaines contrées de la région ouest de la Chine à l'origine de certaines manifestations toxiques chez les animaux qui s'en nourrissaient. Ces animaux présentaient une atteinte des sabots, une anorexie, une diminution de leur croissance et une chute de leurs poils.

En 1560, en Colombie, le Père SIMON a décrit une maladie, voisine de celle appelée actuellement "alkali disease", caractérisée par l'apparition de malformations et de symptômes toxiques chez le poulain et également chez les enfants. Chez ces derniers, il observa une chute des cheveux et une atteinte des ongles.

En 1857, le Docteur T.C. MADISON, Officier et Chirurgien de l'armée américaine, a décrit les symptômes d'une maladie qui affectait les chevaux, les mulets et les poneys indiens d'un détachement stationné à Fort-Randall dans le Dakota du Sud. En 6 mois, il eut de telles pertes que l'efficacité du poste s'en trouva très réduite.

C'est entre 1906 et 1912 qu'un grand nombre de lettres ont été adressées aux agences du gouvernement fédéral des Etats-Unis, lettres émanant de fermiers de certaines régions et signalant des pertes graves parmi les animaux de la ferme, notamment des chevaux. Dans ces régions, sévissait une maladie particulièrement grave qui était désignée sous le nom "d'alkali disease", et les animaux qui en étaient atteints étaient dits "alkalied". En effet, on a attribué aux eaux alcalines et aux sels alcalins des sols de ces régions la cause de cette maladie, d'où le nom "d'alkali disease".

En 1907 et 1908, plus de 15.000 moutons ont succombé dans la seule région de Wyoming. Dans quinze autres Etats américains, plusieurs cas d'empoisonnements chroniques et aigus d'origine inconnue, souvent attribués à des plantes fourragères, ont été décrits.

La présence de sélénium dans les végétaux a été signalée pour la première fois, en France, par TABOURY en 1928. Cette découverte importante a permis, en 1931, aux spécialistes du Ministère de l'Agriculture aux Etats-Unis, dont le Docteur FRANKE et le Docteur KNIGHT (respectivement, Chef de la Section expérimentale du Dakota du Sud et Chef du Bureau de la Chimie des sols), de penser que le sélénium

était la cause de ces incidents et de démontrer, plus tard, l'étiologie de la maladie alcaline "alkali disease" et du tournis "blind staggers" qui sévissaient dans les régions sélénifères des Etats de Wyoming, Nebraska et Dakota du Sud. Dans ce but, en 1932, certaines espèces de plantes sauvages appartenant au genre *Astragalus* ont été testées en vue de connaître leurs propriétés biologiques. Les animaux survivants montraient des lésions qui laissaient penser à une action irritante d'un toxique supposé d'origine minérale. Des études ultérieures réalisées par BEATH, EPPSON et GILBERT (26), ont montré qu'un grand nombre d'espèces végétales sont souvent capables d'accumuler le sélénium à partir du sol. Ces plantes ont été nommées "plantes indicatrices" ou "BEATH's selenium indicators". Leurs teneurs en sélénium variaient de 1 à plusieurs milliers de ppm. Par consommation de plantes de teneurs moyennes en sélénium pendant de longues périodes, les animaux étaient atteints d'une intoxication chronique connue sous le nom de "maladie alcaline", alors qu'à fortes concentrations, ceux-ci succombaient quelques jours après à la suite d'une intoxication aiguë connue sous le nom de "tournis" ou "blind staggers". L'administration des dérivés minéraux du sélénium au bétail et aux animaux de laboratoire entraînait un certain nombre de symptômes, mais cependant on n'a pas pu reproduire "l'alkali disease" ou le "blind staggers". "L'alkali disease" était obtenue uniquement à la suite de la consommation de plantes sélénifères.

Il y a quelques années, KNOTT et Mc CRAY (213) ont rapporté plusieurs cas d'intoxication aiguë et chronique en Australie, dans le district de Richmond dans le Queensland et dans la péninsule du Cap York. L'ingestion de *Neptunia amplexicaulis* et *Morinda reticulata* était à l'origine de cette intoxication, ces deux plantes renferment comme principe actif la sélénocystathionine (311, 312), responsable de la toxicité.

7.1.1. - Description de l'intoxication chez l'animal :

La maladie se présente sous deux formes :

- la forme chronique ;
- et la forme aiguë.

7.1.1.1. La forme chronique : "alkali disease" (maladie alcaline) :

Elle se rencontre surtout dans le Dakota du Sud, s'attaque aux chevaux, aux bovins, aux porcs et à la volaille, les moutons semblent réfractaires. Dans l'ensemble, on peut dire que c'est la kératine qui est affectée : le bétail et les chevaux perdent tout d'abord leurs poils, et surtout ceux de la crinière et de la queue ; la peau perd son élasticité.

Au bout de quelque temps, les pieds deviennent très sensibles, un anneau commence à apparaître au sommet du sabot, au-dessous de la couronne et, dans les cas bénins, le sabot continue à se développer, un autre anneau apparaissant par la suite. Mais, dans les cas graves, le sabot se détache complètement du pied et, pendant le développement du nouveau sabot, l'animal devient boîteux et se déplace difficilement. Comme la maladie attaque tout d'abord les pieds antérieurs, on voit les boeufs "alkalied" paître à genoux. Souvent, les poulains nés de juments intoxiquées par le sélénium présentent des sabots déformés.

Les poussins, ainsi que les poulets issus d'oeufs sains, ne paraissent pas trop affectés. Par contre, quoique fécondés, les oeufs de poules atteintes contiennent des embryons déformés, et le très petit nombre qui éclôt (4 à 12 % des oeufs fécondés) donne des poussins chétifs dont le duvet grasseyeux ressemble plutôt à un fil de fer qu'à des plumes.

7.1.1.2. La forme aiguë : "blind staggers" ou "mad staggers" (tournis) :

Au premier stade de la maladie, les animaux se détachent du troupeau, divaguent convulsivement en cercles et refusent de boire. Ils sont atteints de pica et cherchent à manger le bois, les os et les objets métalliques. Ils ont du mal à apprécier les distances. On note aussi une hyperthermie, une augmentation de la perméabilité capillaire, une polypnée, une néphrite entraînant une glycosurie, une gastro-entérite et une dermatose (164). Le dernier stade est caractérisé par divers degrés de la paralysie, salivation, douleurs abdominales, nécrose hépatique et dégénérescence des muscles cardiaques. La mort s'en suit.

7.1.1.3. Les lésions (forme chronique) :

L'autopsie permet d'observer un tractus digestif peu touché et, parfois, un épaississement épithélial. Le foie est dégénéré, quelquefois friable, la vésicule biliaire est gonflée et distendue, la rate semble normale, les reins sont rarement atteints. Il y a dégénérescence des muscles cardiaques. Au niveau des articulations, on observe une usure assez prononcée des surfaces articulaires. Les gonades sont en général rarement atteintes : elles sont atrophiées, dégénérées, et ne semblent guère fonctionnelles.

7.1.1.4. Toxicologie expérimentale :

"L'alkali disease" a été reproduite expérimentalement chez les veaux âgés d'un an, nourris avec du foin d'orge pendant 46 jours (254). L'orge a été cultivée dans un terrain

où poussait de l'*Astragalus bisculatus*, plante indicatrice de sélénium. Le foin avait finalement une teneur de 25 ppm en sélénium.

Quatre semaines après le début du traitement, les animaux présentaient une raideur au niveau des articulations. Au niveau des sabots, on notait la présence de fissures longitudinales et verticales, et le détachement a eu lieu 3 mois après.

Chez le porc, MOXON (272), en 1937, a réussi à reproduire expérimentalement "l'alkali disease". 14 jours après le début du traitement qui consistait à administrer aux porcs du blé sélénifère, les premiers symptômes sont apparus : il s'agissait principalement d'une alopecie étendue.

7.1.2. - Description de l'intoxication chez l'homme :

Une sélénose d'origine organique a été décrite chez l'homme par ROSENFELD et BEATH (340). Il s'agit de personnes vivant dans une région sélénifère aux Etats-Unis. Cette sélénose est caractérisée par une dermatite chronique, de la fatigue et de l'anorexie. On note, à côté de ceci, une instabilité émotionnelle, une gastro-entérite, une dégénérescence hépatique et une splénomégalie. Il y a aussi atteinte des cheveux et des ongles.

Les aliments avaient une teneur en sélénium allant de 8 à 30 ppm. Les symptômes ont disparu à la suite du remplacement des produits alimentaires par des produits provenant de régions non sélénifères.

KERDEL-VEGAS et son équipe (205) ont rapporté le cas d'une intoxication aiguë à la suite de l'ingestion des fruits du coco de mono (*Lecythis ollaria*), arbre poussant en Amérique Centrale et en Amérique du Sud. Les principaux symptômes consistent en des troubles digestifs : nausées, vomissements et diarrhées. A cette première phase, fait suite une deuxième caractérisée par la chute des poils et par l'atteinte du cuir chevelu. Ceci a lieu une à deux semaines après l'ingestion des fruits. Cependant, l'alopecie n'est pas définitive.

La toxicité est due à la présence de sélénocystathionine isolée et identifiée par ARONOW (19) et RUSSEL et son équipe (205). Son action épilatoire a déjà été étudiée en 1962 par PALMER (299), chez la souris.

7.2. INTOXICATIONS INDUSTRIELLE, THERAPEUTIQUE ET ACCIDENTELLE --

La toxicologie industrielle, thérapeutique et accidentelle du sélénium et de ses dérivés, a été étudiée et revue en détail par plusieurs auteurs (63, 80, 135, 216, 243).

7.2.1. - Les différents dérivés :

7.2.1.1. L'hydrogène sélénié :

En se basant sur sa valeur limite de concentration, 0,05 ppm, les hygiénistes américains ont évalué la toxicité de l'hydrogène sélénié à 15 fois celle de l'hydrogène sulfuré. Une exposition à 0,3 ppm pendant 4 heures s'est avérée très dangereuse. Une concentration de 1 à 4 µg par litre d'air provoque une irritation des voies respiratoires supérieures, une anosmie, un oedème pulmonaire, une pneumonie et la mort.

A la vérité, si l'hydrogène sulfuré provoque chaque année un certain nombre de morts, l'hydrogène sélénié n'a jamais été responsable, chez l'homme, d'un seul cas mortel ou d'une maladie dont la durée a excédé 10 jours. En effet, 8 cas d'intoxication par ce gaz ont été publiés, 5 en laboratoire et 3 en milieu industriel : aucun n'a été mortel et aucun sujet n'a présenté des séquelles 10 jours après l'exposition.

Deux facteurs peuvent expliquer cet apparent paradoxe :

- premièrement, ce fait tient sans conteste à ce que dans l'industrie de la soie artificielle, du caoutchouc et de la tannerie, l'hydrogène sulfuré est employé par tonnes, tandis que l'hydrogène sélénié n'est jamais utilisé en grande quantité ;
- deuxièmement, si l'hydrogène sélénié n'a pas provoqué de cas mortels, c'est qu'il est très facilement ramené par oxydation à la forme de sélénium rouge à la surface des muqueuses nasales, et probablement dans les alvéoles pulmonaires. Chez les sujets atteints, on a décrit la formation de plaques rouges sur la muqueuse nasale. Il semble que cette rapide décomposition de l'hydrogène sélénié explique l'absence de suites fatales.

- TOXICITES AIGUE ET SUBAIGUE :

Les symptômes d'intoxication par l'hydrogène sélénié sont semblables à ceux que provoquent l'anhydride sulfureux et certains gaz industriels irritants. La toxicité de l'hydrure de sélénium se caractérise chez l'humain par une irritation importante des muqueuses des voies respiratoires supérieures, de l'arbre trachéo-bronchique et des alvéoles

pulmonaires, traduite par un coryza, larmoiement, toux et éternuement, auxquels succède une légère oppression thoracique. L'exposition aiguë et subaiguë à ce gaz engendre de l'asthénie, de la lassitude, des étourdissements et des vertiges accompagnés rapidement d'haleine alliacée, de dysgueusie métallique et d'anosmie suivies, dans les jours suivants, de rhinorrhée purulente et d'éternuements. Ce tableau clinique s'accompagne de nausées et de vomissements.

Les symptômes disparaissent et la période de latence peut durer de 6 à 8 heures. A l'expiration de ce délai, le patient qui, souvent, a regagné son domicile, se réveille dans son lit, haletant, avec un oedème pulmonaire en cas d'intoxication aiguë.

Les résultats biologiques obtenus (sélénium urinaire) établissent relativement peu de corrélation entre l'exposition (aiguë ou subaiguë) et l'augmentation du sélénium urinaire. Il faut donc apprécier l'intoxication à la lumière de l'exposition et du tableau clinique présenté par les sujets affectés, plutôt qu'attendre la confirmation d'une analyse au laboratoire, peu ou pas confirmative.

7.2.1.2. L'anhydride sélénieux :

L'intoxication par l'anhydride sélénieux provoque :

- des troubles aigus localisés ;
- des troubles organiques généralisés ;
- éventuellement, des troubles à long terme.

7.2.1.2.1. - TROUBLES AIGUS LOCALISES :

7.2.1.2.1.1. Les poumons :

L'inhalation brutale d'anhydride sélénieux peut provoquer un oedème pulmonaire consécutif à une action irritante localisée aux alvéoles pulmonaires. L'oxygénothérapie et l'hospitalisation ont été nécessaires dans certains cas, mais sans séquelles.

7.2.1.2.1.2. La muqueuse gastrique :

Certains sujets qui n'ont encore jamais souffert de dyspepsie commencent à éprouver des douleurs épigastriques légères après les repas ; d'autres, déjà sujets à la dyspepsie, constatent, lorsqu'ils travaillent dans une ambiance contenant de l'anhydride sélénieux, une aggravation des douleurs accompagnant les troubles de digestion.

Un cas d'hématémèse a été rencontré. Le patient a été traité en milieu hospitalier et n'a jamais pu être affecté à un poste comportant une exposition au sélénium.

7.2.1.2.1.3. L'épiderme :

Les autres troubles aigus résultent du contact avec la peau, les ongles et les yeux :

- La peau : le contact avec la peau peut provoquer des brûlures ou une dermite généralisée.
 - . Les brûlures : elles sont rarement graves, et si elles sont traitées comme il convient, elles guérissent sans laisser de cicatrice.
 - . La dermite : elle débute généralement aux endroits où la poussière entre en contact avec le poignet et le cou, et elle peut s'étendre aux zones adjacentes des bras, du visage et de la partie supérieure du tronc. Elle se manifeste généralement par des papules prurigineuses d'un rouge discret qui peuvent devenir confluentes au poignet, endroit où l'anhydride sélénieux peut parvenir à s'infiltrer entre le gant et la manche du vêtement de travail. On note parfois une éruption allergique sur tout le corps, du type urticaire vrai. Dans ce cas, le sujet devient allergique aux minuscules cristaux d'anhydride en suspension dans l'air, et il doit non seulement être déplacé, mais encore renoncer à tout travail comportant une exposition au sélénium.
- Les ongles : dans de nombreux cas, le lit de l'ongle devient atrocement douloureux par suite de l'infiltration de l'anhydride sélénieux sous le bord libre de l'ongle.
- Les yeux : si un individu travaille dans une ambiance contenant des poussières d'anhydride sélénieux, ces poussières peuvent engendrer un état que les ouvriers appellent "l'oeil rose". Cela consiste en une décoloration en rose de la peau des paupières qui, généralement, se boursoufflent. Ordinairement, il y a aussi une conjonctivite de la conjonctive bulbaire. Il faut généralement 2 à 3 semaines pour que se dissipe l'état appelé "l'oeil rose", la phase prurigineuse lui succède.

Après des expositions permanentes ou répétées, certains ouvriers présentent une allergie palpébrale. Ils ont les yeux gonflés chaque fois qu'ils pénètrent dans des locaux où d'autres ouvriers travaillent sans ressentir d'effets nocifs.

Les yeux sont souvent le siège de conjonctivite et de blépharite avec ou sans blépharospasme. DUVOIR (104) a cité le cas d'un prurit périorbitaire chez un ingénieur chimiste qui reprenait des manipulations avec du sélénium interrompues depuis 6 mois ; le lendemain soir, les accidents cutanés ont débuté par un prurit périorbitaire "assez gênant pour troubler le sommeil".

7.2.1.2.2. - TROUBLES ORGANIQUES GENERALISES :

7.2.1.2.2.1. Odeur alliagée :

Le premier et le plus caractéristique des symptômes de l'absorption du sélénium est l'odeur alliagée que présente l'haleine. C'est généralement la famille de l'ouvrier qui s'en aperçoit la première, et si le sujet n'est pas soustrait à l'exposition au sélénium ou protégé contre ses effets, cette odeur devient de plus en plus forte. Dans l'industrie, on pense que ce signe est une indication manifeste d'absorption de sélénium ; des ouvriers ont été mutés pour cette seule raison et, une fois leur haleine redevenue normale, ont repris leurs activités professionnelles les exposant au sélénium. Cependant, l'odeur alliagée de l'haleine n'est pas un indice fiable de l'absorption du sélénium car elle peut ne pas exister chez un sujet dont le taux d'excrétion urinaire est de 0,1 mg/litre, alors que, dans la plupart des cas, les ouvriers présentant un taux d'excrétion de 0,5 à 1 mg/litre ont une haleine fortement alliagée. Cette odeur disparaît en l'espace de 7 à 10 jours si le sujet est soustrait à l'exposition au sélénium. Il n'en est pas de même lorsque l'odeur de l'haleine est imputable au tellure : il faut alors 1 à 3 mois.

L'origine de cette odeur alliagée peut :

- soit provenir du tellure présent dans le sélénium sous forme d'impuretés car le tellure donne à l'haleine une odeur identique, à ceci près qu'elle est plus forte et plus durable. De même, le tellure est associé au sélénium dans les boues de l'affinage du cuivre. Cependant, cette odeur a été aussi présente dans le cas du sélénium ultra-pur : 99,999 % ;
- soit être due au diméthyl-sélénium. Cette explication est la plus probable, et ce pour trois raisons :
 - . tout d'abord, parce que la méthylation dans le foie est un mode courant de détoxication,
 - . en second lieu, du fait que le diméthyl-sélénium s'est révélé être la cause de l'odeur alliagée émise par les bactéries qui se développent dans un milieu à base de sélénium,
 - . troisièmement, parce qu'il a été démontré que l'odeur alliagée de l'haleine des petits mammifères lui était imputable.

7.2.1.2.2.2. Goût métallique :

Le second symptôme est un goût métallique, ce qui constitue un signe plus précoce et plus subtil que l'odeur alliagée de l'haleine. Cependant, il est plus discret ; il est fréquent qu'il passe inaperçu des ouvriers, et c'est pourquoi il ne peut pas non plus être considéré comme un signe indubitable d'absorption de sélénium.

7.2.1.2.2.3. Troubles psychologiques mal définis :

Ce troisième groupe d'effets généralisés comprend des troubles assez mal définis. Comme ils ont été notés tant chez des sujets travaillant dans l'industrie que dans des familles rurales vivant sur des terrains sélénifères, on les a inclus dans la liste bien qu'il soit impossible de savoir avec certitude s'ils ne sont pas imputables soit à la gêne que crée l'application des mesures de sécurité, soit à l'insuffisance numérique des équipes et à l'exiguïté des locaux de travail.

Cependant, certains ouvriers ont remarqué qu'ils étaient pâles, las et irritables, quand leur travail les mettait en contact avec le sélénium, et que ces symptômes disparaissaient lorsque cessait l'exposition. On n'a pas signalé de cas d'anémie. Un ouvrier, de nature placide et d'humeur égale, a constaté que lorsque son travail l'exposait au sélénium, le soir venu, il se sentait fatigué, n'avait pas le courage de bêcher son jardin et ne supportait pas la présence de ses enfants. Ces symptômes sont trop imprécis pour qu'il soit possible d'en donner une expression quantitative, mais on doit y prendre garde car ils peuvent être à l'origine de problèmes de personnel dans les services où l'on utilise le sélénium.

Tous les troubles locaux, aigus ou organiques généralisés, se dissipent spectaculairement si le sujet est soustrait à l'exposition à l'anhydride sélénieux ou protégé contre elle.

7.2.1.2.3. - TROUBLES EVENTUELS A LONG TERME :

Chez l'homme, bien que l'on note pâleur et vertiges, il semble que les systèmes hématopoïétique et nerveux échappent à toute atteinte, de même que le foie et les reins. Par contre, il faut demeurer vigilant afin de dépister une éventuelle lésion hépatique ou rénale car, chez les animaux, le foie et les reins sont les plus gravement atteints en cas d'absorption de sélénium.

7.2.1.2.4. - DOSES TOXIQUES :

La dose létale par inhalation a été déterminée par MOXON et RHIAN (274). Chez l'homme, elle est de 1,8 à 2,1 ppm pour une durée d'exposition de 8 heures, et de 10 ppm pour une durée de 2 heures.

Sa présence dans la nourriture est extrêmement toxique : une teneur de 3 à 15 ppm entraîne une toxicité chronique, alors que la toxicité subaiguë apparaît à une teneur de 15 à 25 ppm.

7.2.1.3. Le sélénium élémentaire :

Toutes les observations montrent que le sélénium élémentaire est relativement dénué de toute toxicité. Le seul cas où une irritation a été observée a été l'exposition à la poussière fine ou à la fumée de sélénium. Chez les ouvriers exposés, on a observé une irritation des voies respiratoires supérieures, une catarrhe, épistaxis et perte de la sensibilité olfactive (14). Le port de masques et une ventilation efficace des locaux ont permis d'éviter l'apparition de ces symptômes.

L'atteinte de la peau est rare. Il s'agit d'une dermatite qui apparaît sur le dos des mains des ouvriers qui ont manipulé le sélénium (14).

PRINGLE (324) a rapporté le cas d'une brûlure du premier degré de la face, provoquée par le contact avec du sélénium en fusion. Aucun signe de toxicité propre au sélénium n'a eu lieu, à part les atteintes causées par la chaleur. La guérison était complète 3 semaines après.

La toxicité de la fumée de sélénium vis-à-vis de l'homme a été revue en détail par CLINTON (74) en 1947. Il a cité le cas d'une intoxication dans un atelier de recyclage de métaux riches en sélénium. Les fumées de sélénium rouge se sont échappées dans le lieu de travail, entraînant immédiatement une irritation intense des yeux, du nez et de la gorge. Les fumées avaient une odeur alliagée, désagréable et aigre. Les ouvriers exposés avaient une sensation de brûlure, un rougissement des yeux et des maux de tête frontaux. Ces derniers ont commencé 2 à 4 heures après l'exposition et se sont maintenus 24 heures. D'autres symptômes, observés uniquement chez les ouvriers les plus touchés, consistaient en une difficulté de respiration, un oedème pulmonaire et, dans un seul cas, une dyspnée aiguë. L'haleine, dans aucun des cas, n'avait une odeur alliagée, bien que certains ouvriers se soient plaints d'une dysgueusie métallique. Le sélénium n'a pas été décelé dans les urines des ouvriers, même les plus exposés. Le taux des leucocytes et l'hématocrite étaient normaux. 3 jours après, les signes ont disparu sans laisser de séquelles.

Selon CLINTON (74), l'absence du sélénium dans les urines est due à l'irritation interne qui a permis de limiter la durée d'exposition et d'empêcher ainsi l'absorption de quantités notables de sélénium.

- OBSERVATION :

Tous les signes déjà décrits ne sont pas forcément imputables au sélénium élémentaire, vu la présence et la production d'oxyde de sélénium (anhydride sélénieux) en proportions plus ou moins importantes. En effet, lorsque le sélénium

est porté à ébullition à l'air, il peut s'oxyder facilement, et les fumées qui se dégagent peuvent contenir jusqu'à 50 % d'anhydride sélénieux malgré la couleur rouge qu'elles présentent.

7.2.1.4. L'oxychlorure de sélénium :

Il s'agit d'un liquide incolore à température ordinaire. Il possède des propriétés vésicantes entraînant l'apparition de brûlures du troisième degré (100). Ces brûlures sont extrêmement douloureuses et la guérison est lente.

7.2.1.5. Le diméthyl-sélénium :

MOTLEY et son équipe (271) ont rapporté le cas d'une intoxication collective dans un laboratoire, à la suite de l'exposition du personnel au diméthyl-sélénium éliminé en grande quantité par les animaux de laboratoire intoxiqués expérimentalement.

Plusieurs attaques caractérisées par un mal de gorge ont été rapportées. Chaque attaque a duré 3 à 4 jours, avec complications au niveau des voies respiratoires supérieures : bronchite persistante pendant 2 semaines. La toux a régressé au bout de ce temps.

L'attaque ressemblait à une infection bactérienne des voies respiratoires.

7.2.1.6. L'acide sélénique :

7.2.1.6.1. - INTOXICATION COLLECTIVE CHEZ L'HOMME :

Une intoxication collective a été décrite par ROSENHEIM et TUNNICLIFFE en 1901 (341). Elle était due à la consommation de bière obtenue par hydrolyse du malt au moyen d'acide sulfurique impur contenant du sélénium et de l'arsenic.

7.2.1.6.2. - INTOXICATION INDUSTRIELLE :

Elle a été décrite par BROWNING (42). Le contact avec l'acide sélénique provoque une lésion ressemblant au purpura, avec inflammation de la zone entourant les follicules des cheveux. Parfois, on trouve des zones ulcérimorphes.

7.2.1.7. L'acide sélénieux et le sélénite de sodium :

7.2.1.7.1. - TOXICITE CHEZ L'HOMME :

7.2.1.7.1.1. Intoxication accidentelle :

Il s'agit d'un cas d'intoxication au "Murlex", produit liquide, incolore, inodore, renfermant de l'acide sélénieux à 1,81 % et utilisé dans le polissage des armes. Il permet de rendre à ces derniers leur éclat.

En 1966, CARTER (60) a rapporté le cas d'une intoxication chez un enfant qui avait avalé le contenu d'un flacon de "Murlex". La mort est survenue 45 minutes après son admission à l'hôpital. L'enfant présentait des symptômes digestifs (salivation abondante et vomissements), des convulsions, et son haleine avait une odeur alliagée. Ensuite, est survenue une perte de conscience et de la sensibilité, puis une cyanose périphérique aboutissant à la mort.

A l'autopsie, les organes ne présentaient aucune odeur alliagée. Cependant, l'estomac avait une odeur aigre, avec congestion et oedème de la muqueuse gastrique.

7.2.1.7.1.2. Intoxication industrielle :

Plusieurs cas d'intoxications ont été rapportés par PRINGLE (324). Les lésions cutanées sont identiques à celles observées lors d'une exposition à l'anhydride sélénieux.

7.2.1.7.2. - TOXICITE CHEZ L'ANIMAL : ACCIDENTELLE :

Un cas d'intoxication aiguë a été signalé par GABBEDY (125). Cet accident a eu lieu en 1968, en Australie. Dans cette région, on traitait avec du sélénite de sodium une maladie, appelée dystrophie musculaire, chez les moutons.

Un fermier a remarqué des cas de faiblesse musculaire chez certains agneaux nés en juillet-août 1968. Il a administré à ses moutons, par voie orale, 7,5 ml de solution de sélénite de sodium dont l'analyse a montré ultérieurement qu'elle contenait 8,5 mg de Se par millilitre. Ces agneaux sont restés 2 heures dans le parc, puis on les a conduits à 200 mètres environ. Pendant ce trajet, 2 agneaux sont morts, puis 60 autres quelques heures plus tard. Le lendemain, le fermier a encore eu 130 décès. Finalement, 10 agneaux sont restés en vie, mais très faibles.

Après analyse, il s'est avéré que la dose ingérée était de 6,4 mg/kg.

L'autopsie, pratiquée sur les moutons morts 2 jours après cette ingestion, n'a mis en évidence qu'une atteinte des poumons qui étaient congestionnés et une décoloration jaune du muscle cardiaque, laissant penser à une infiltration graisseuse. Un agneau présentait des lésions des pattes arrières que l'on a pu confirmer histopathologiquement comme dystrophie musculaire. L'examen des poumons, foie, coeur et muscles, n'a révélé aucune lésion spécifique. Les poumons accusaient un oedème avec épaississement des parois alvéolaires, et le foie montrait une transformation graisseuse marquée mais diffuse.

15 jours après l'administration, 4 agneaux ont été sacrifiés pour autopsie. Les animaux étaient dans un mauvais état, mais ne présentaient pas de lésions cohérentes. Un agneau avait les surrénales pâles, décolorées, un autre avait

le foie légèrement hypertrophié et la musculature paraissait normale. A l'examen histopathologique, il n'y avait pas de changements dans le foie, les reins, la rate et le muscle cardiaque, directement attribuables aux effets du sélénium.

Plusieurs autres cas d'intoxications par le sélénite de sodium chez des agneaux ont été signalés par différents auteurs (124).

7.2.1.8. La sélénocystine :

Un cas d'intoxication chez l'homme a été rapporté par WEISBERGER et SUHRLAND (438), en 1956, et ceci à la suite de l'administration de la D.L-sélénocystine à quelques malades souffrant d'une leucémie. Les symptômes observés étaient voisins de ceux observés à la suite de l'ingestion du coco de mono : nausées, vomissements et alopécie.

7.2.1.9. Le sulfure de sélénium :

Il s'agit, dans tous les cas, d'une intoxication d'origine thérapeutique.

RANSONE (326) a rapporté le cas d'une intoxication chronique à la suite de l'usage prolongé d'un shampooing à base de sulfure de sélénium. Une femme, âgée de 46 ans, souffrant de crises périodiques d'anorexie et de fatigue générale, utilisait depuis plus de 8 mois, 2 à 3 fois par semaine, un shampooing à base de sulfure de sélénium, et ceci à la suite d'une atteinte du cuir chevelu. Une heure après l'application de shampooing, la femme se plaignit de tremblements désordonnés au niveau des mains et des bras, accompagnés d'une transpiration abondante. Une heure après, elle ressentit un goût métallique et une odeur alliagée de l'haleine. Les tremblements régressèrent à la huitième heure et furent suivis d'une douleur continue au niveau de la partie inférieure de l'abdomen. Dans les 3 jours qui ont suivi, les principaux symptômes consistaient en une anorexie, une léthargie et une fatigue générale. Il y a eu aussi des vomissements, le goût métallique a persisté jusqu'au cinquième jour. La teneur en sélénium dans les urines variait ainsi :

4 ^e - 5 ^e jours.....	28 µg/ml
5 ^e - 6 ^e jours.....	32 µg/ml
9 ^e -10 ^e jours.....	0 µg/ml !

La méthode utilisée était la polarographie classique.

ORENTRICH et BERGER (297) ont rapporté les cas d'alopécies diffuses chez 6 femmes ayant utilisé le shampooing à base de sulfure de sélénium pendant des périodes allant de 3 semaines à 3 ans. Dans tous les cas, l'alopécie était réversible, et la chute des cheveux s'est arrêtée dès l'arrêt du traitement.

Chez 2 femmes, ils ont observé une dysplasie au niveau des racines des cheveux.

ALBRIGHT et HITCH (8) ont rapporté 7 cas d'irritations cutanées chez les 108 malades atteints de tinea versicolor et traités avec une suspension de sulfure de sélénium à 2,5 %.

7.2.1.10. Les colorants à base de sélénium :

Les colorants à base de sélénium sont constitués d'un mélange de sulfure de cadmium, anhydride sélénieux et sélénium élémentaire, en proportions différentes. Un cas d'intoxication, à la suite de l'usage d'un rouge à lèvres, a été signalé en 1947 par BUCHAN (43). La personne présentait les symptômes suivants : nervosité, suivie d'une dépression mentale, un goût métallique, des nausées et des vomissements.

7.2.2. - Toxicologie expérimentale chez l'homme :

RICHAUD et HAZARD (330) ont constaté l'innocuité du sélénium élémentaire colloïdal en administrant 2 à 5 ml d'une solution de 0,01 à 0,02 % par voie intra-musculaire, une fois par semaine. Aucun effet secondaire n'a été observé.

DUMERY (103) a réalisé des essais de toxicité en badigeonnant la peau de trois volontaires, porteurs de pityriasis versicolor ancien et rebelle, d'un hydrosol isotonique de sélénium colloïdal. Les badigeonnages étaient quotidiens pendant un mois. Le prurit a disparu en 24 heures, les squames n'existaient plus au troisième jour, la peau est redevenue normale au bout d'une semaine, aucune intolérance cutanée ou générale n'a été observée. L'innocuité a été depuis contrôlée sur 150 sujets traités.

Les effets d'une combinaison sélénium - vitamine E (déjà cités) ont été testés chez l'homme.

7.2.3. - Toxicologie expérimentale chez l'animal :

Plusieurs effets sont observés et sont résumés ainsi :

7.2.3.1. Comportement général :

Selon BEL (28), les anomalies de comportement sont minimales et transitoires. Elles sont représentées par :

- de l'agitation, chez les animaux intoxiqués par la dose de 5 mg o/oo de sélénium sous forme de sélénite de sodium additionné à l'eau de boisson, entre la quatrième et la sixième semaine, et d'une hypotonie généralisée au cours de la neuvième semaine ;

- de l'apathie, apparue entre la sixième et la neuvième semaine, chez ceux recevant le sélénium à la concentration de 10 à 15 mg o/oo.

7.2.3.2. Effet sur la croissance et la longévité :

L'effet sur la croissance et la longévité est fonction de la dose de sélénium administrée. Ainsi, à faible dose, variant avec le sexe, l'espèce animale et le régime alimentaire, le sélénium joue le rôle d'oligo-élément, permettant de réaliser un engraissement, un gain de poids et une meilleure croissance. Il permet, en outre, de protéger contre certaines maladies de carence en sélénium, dont la diathèse exsudative et la dystrophie musculaire. Cet effet sera vu plus en détail ultérieurement.

Mc LEAN, THOMSON et CLAXTON (253) ont observé chez les brebis auxquelles, tous les 7 à 10 jours, ils ont administré par voie sous-cutanée 1 mg de sélénium sous forme de séléniate de sodium, une amélioration du taux de croissance, 2 à 3 semaines après le début du traitement. La réponse a été très rapide.

HALVERSON (155), en 1974, a réalisé une étude comparative sur la croissance et la reproduction, chez différents groupes de rats auxquels il a administré du sélénium dans la nourriture. La teneur en sélénium était, respectivement, 0,1, 1, 2,5 et 5 ppm. Chez les deux premiers lots, il a observé une croissance rapide. Cette dernière n'a été que légèrement améliorée chez le groupe qui a reçu une nourriture supplémentée à 2,5 ppm. Enfin, à 5 ppm, l'effet toxique a compensé l'effet nutritionnel. Aucune amélioration n'a été observée.

Les résultats observés chez les mâles sont plus significatifs que ceux observés chez les femelles, laissant penser que la croissance et le développement des mâles nécessitent beaucoup plus la présence du sélénium dans la nourriture que les femelles.

L'action d'une dose toxique sur la croissance et la longévité a été étudiée par SCHROEDER et MITCHENER (356, 357), chez les rats et les souris, et encore plus en détail par TINSLEY et son équipe (416) chez les rats. Les résultats observés varient avec le sexe, l'état d'oxydation du sélénium, l'espèce étudiée et la durée d'administration.

SCHROEDER et MITCHENER (356) ont administré à différents lots de rats mâles et femelles du sélénium dans l'eau de boisson à 2 ppm, sous forme soit de sélénite, soit de séléniate de sodium. Un an après le début du traitement, la teneur a été amenée à 3 ppm.

Aucune variation de la croissance n'a été observée chez les rats mâles consommant l'eau supplémentée en séléniate pendant 36 mois. Les femelles présentaient cependant un

gain de poids au vingt-quatrième mois. Par contre, les rats femelles qui ont reçu du sélénite présentaient le phénomène inverse : chute de poids et retard de la croissance. Ce phénomène est encore plus frappant chez les mâles dès le deuxième mois. On note une mortalité de 50 % au cinquante-huitième jour à partir duquel le sélénite a été remplacé par du séléniate. Chez les survivants, on a alors observé un regain de poids et une reprise de la croissance.

La chute du poids a lieu chez tous les lots, entre le 24^{ème} et le 30^{ème} mois, et est plus accusée chez les lots témoins que chez les lots essais :

Mâles témoins.....	- 23,2 %
Mâles + séléniate.....	- 16,7 %
Femelles témoins.....	- 9,6 %
Femelles + séléniate.....	+ 2,7 %

Le séléniate semble ainsi avoir un effet bénéfique sur la croissance.

En ce qui concerne la longévité, aucune différence n'a été observée entre les lots témoins et les lots essais ayant reçu du séléniate.

SCHROEDER et MITCHENER (357) ont repris les mêmes expériences sur les souris qu'ils ont divisées en plusieurs lots de 100 souris environ chacun, dont un lot témoin. Plusieurs lots essais, constitués séparément de souris mâles et femelles, ont reçu du sélénium sous forme soit de sélénite, soit de séléniate de sodium, dans l'eau de boisson à 3 ppm. Le poids a été mesuré toutes les semaines jusqu'à l'âge de 3 mois, puis à un intervalle de 1 mois.

Lorsque le sélénium a été additionné à l'eau sous forme de séléniate de sodium, aucune modification du poids et du taux de croissance n'a été observée chez les deux sexes, à l'exception des souris mâles d'un an.

Lorsque le sélénium se trouvait sous forme de sélénite de sodium, on note, chez les souris mâles, un gain de poids. L'effet contraire est observé chez les femelles.

La chute de poids a lieu ensuite chez tous les groupes (témoins et essais) entre le douzième et le dix-huitième mois. Cette perte est cependant plus prononcée chez les souris exposées au sélénite :

Mâles + sélénite.....	- 23 %
Mâles témoins.....	- 13,2 %
Femelles + séléniate.....	- 12,1 %
Femelles témoins.....	- 6,3 %

En ce qui concerne la longévité, les expériences ont été réalisées sur des souris mâles et femelles divisées en plusieurs lots, dont le nombre de souris variait entre

48 et 56. On constate une augmentation de la longévité chez les souris mâles exposées aux sélénites et aux séléniates. Les femelles présentent le phénomène inverse.

TINSLEY et son équipe (416) ont réalisé les expériences sur les rats mâles et femelles, et évalué les résultats en fonction de la teneur en sélénium dans la nourriture qui variait de 0,5 à 16 ppm suivant le lot, de la teneur en protéines (caséine) qui était respectivement de 12 et 22 %, de l'état d'oxydation du sélénium, et enfin du sexe.

Chez le groupe témoin, la courbe de croissance répond aux équations suivantes :

$$W = A_1 e^{K_1 t} \text{ pendant les 5 premières semaines,}$$

$$W = A_2 - B e^{-K_2 t} \text{ pour le reste de la vie,}$$

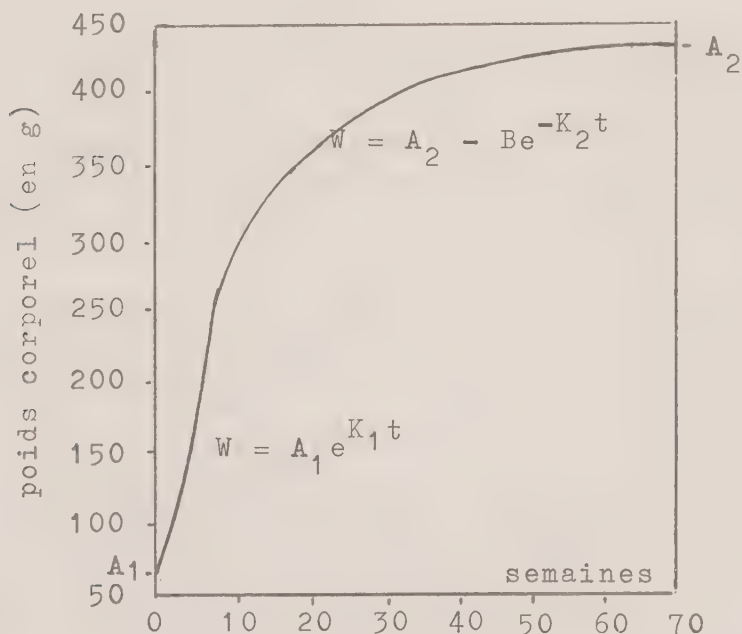
- où :

A_1 est le poids initial.

K_1 = constante. Plus K_1 est grand, plus courte sera la durée pendant laquelle la croissance suit cette courbe.

A_2 = poids maximal.

K_2 et B = constantes.



K_1 = une augmentation de la teneur en sélénium de la nourriture réduit la valeur de K_1 . Aucune différence n'existe entre la forme sélénite et la forme séléniate. Le sexe ne joue aucun rôle puisque K_1 décroît de la même manière chez les mâles et les femelles. Lorsque la teneur en protéines passe de 22 à 12 %, K_1 diminue aussi.

A_2 = la réponse varie dans le même sens chez les deux sexes, mais une nette différence réside entre la forme sélénite et la forme séléniate. Cette dernière entraîne une décroissance de A_2 plus importante, donc semble être plus toxique. Une modification de la teneur en protéines diminue A_2 .

Si on étudie le taux de décroissance de A_2 en fonction de la teneur en sélénium, la réponse chez les mâles est supérieure à celle observée chez les femelles.

K_2 = le sélénium augmente la valeur de K_2 . Ceci signifie que la valeur A_2 est atteinte plus rapidement. Le sexe n'intervient pas ici, et la forme chimique non plus chez le mâle, mais chez la femelle, le séléniate a un effet plus marqué que le sélénite. La variation de la teneur en protéines est sans aucun effet chez les femelles. Cependant, chez les mâles, on note une élévation de la valeur de K_2 lorsque la teneur passe de 22 à 12 %.

- CONCLUSION :

Lorsque le taux de sélénium augmente, on observe une baisse du taux de croissance : K_1 diminue, la courbe atteint plus rapidement la valeur A_2 qui, elle, est abaissée.

7.2.3.3. Systèmes cardio-vasculaire et circulatoire :

GLENN (133) a réalisé une intoxication expérimentale chez un lot de brebis auxquelles il a administré du séléniate de sodium dans la nourriture pendant plusieurs mois. Les principales modifications pathologiques observées sont localisées au niveau du tissu cardiaque (dégénérescence, nécrose et fibrose).

HEINRICH et Mc CANON (173), à la suite de l'administration par voie intra-veineuse à des chiens d'une dose unique de 2 mg/kg de sélénite de sodium, ont observé une chute de la pression sanguine totale et une élévation de la tension artérielle pulmonaire. La mort est survenue 30 minutes après. Ils ont observé une accélération cardiaque qui était suivie de bradycardie arythmique, interrompue occasionnellement par une tachycardie et une fibrillation. L'étude de l'électrocardiogramme montre une inversion du segment T, prolongation de QT, et souvent un signe de blocage atrio-ventriculaire. Des battements ectopiques ont été observés pendant toute la période de bradycardie.

Au niveau du sang, HEINRICH et Mc CANON (173), puis HEINRICH (172), ont observé une hémococoncentration et une acidose. L'hémococoncentration a été observée chez le chien à la suite d'administration par voie intra-veineuse d'une dose

unique de sélénite de sodium, la dose variait entre 0,1 et 2 mg/kg. L'hémoconcentration était suivie d'une élévation de la concentration plasmatique en protéines, concentration d'autant plus marquée que la dose était plus élevée.

Ils ont observé en outre :

- une augmentation de la teneur du potassium plasmatique. Ceci, selon les auteurs, est dû à plusieurs facteurs :
 - . hémoconcentration,
 - . libération d'épinéphrine,
 - . inhibition directe du métabolisme cellulaire,
 - . anoxie tissulaire due à une déficience circulatoire ;
- une augmentation de la teneur en lactate et en pyruvate due à une :
 - . libération d'épinéphrine,
 - . augmentation de l'activité musculaire qui suit la stimulation de la respiration,
 - . hémoconcentration.

L'hémoconcentration serait due à une augmentation de la perméabilité capillaire.

7.2.3.4. Système hématopoïétique :

GLENN et son équipe (133) ont observé, à la suite de l'administration de sélénite de sodium à des brebis, une atrophie des centres "germinatifs" des nodules lymphatiques et de la rate. HALVERSON (154) a observé chez les rats nourris par rations supplémentées en sélénite de sodium une anémie hémolytique suivie d'hémoglobulinémie, associée à une atteinte hépatique, une congestion de la rate et des reins, et à un ictère.

L'addition d'arsénite de sodium à la nourriture permet de réduire d'une manière significative l'hémolyse, et favorise la sécrétion biliaire du sélénium (234).

7.2.3.5. Système respiratoire :

HEINRICH et Mc CANON (173), à la suite de l'administration par voie intra-veineuse de sélénite de sodium aux chiens préalablement anesthésiés, ont observé une dépression respiratoire précédant la mort. Ultérieurement, en 1961 (174), ils ont démontré, chez la même espèce, que la dépression respiratoire est précédée d'une stimulation de la respiration : tachypnée, réduite progressivement pour aboutir à une apnée. Ces observations sont en relation avec les modifications constatées au niveau des composants sanguins.

L'hydrogène sélénié, d'après DUDLEY et MILLER (101), entraîne chez les cobayes une bronchopneumonie.

7.2.3.6. Système digestif :

HARR et son équipe (162) ont étudié la toxicité hépatique du sélénium chez les rats recevant une nourriture supplémentée en sélénium, dont la teneur variait de 0,5 à 16 ppm. Pour chaque lot, deux teneurs différentes en protéines ont été administrées : 12 et 22 % de caséine. La nourriture était additionnée, dans tous les cas, de vitamines A, D et E. Trois sortes de lésions ont été observées :

- hépatite toxique aiguë, associée à une dystrophie osseuse, ictère et déséquilibre liquidien ;
- hépatite toxique chronique, associée à une congestion passive chronique, réticulose, myocardite, hyperplasie du canal biliaire et nécrose hépatique ;
- hyperplasie hépatique.

7.2.3.6.1. - HEPATITE TOXIQUE AIGUE :

Elle est observée en général chez les rats qui ont reçu une nourriture dont la teneur en sélénium est de 4, 6, 8 et 16 ppm, respectivement. La durée de vie de ces animaux est inférieure à 100 jours. Cette hépatite est accompagnée d'hydrothorax, ascite, oedème péricardique et d'un ictère.

Macroscopiquement, le foie est dur, irrégulier et pâle. On note la présence de taches jaunes pâles ou blanches.

Microscopiquement, les hépatocytes tendent à se vacuoliser. Leur protoplasme devient granuleux et se concentre en mottes irrégulières. D'autres cellules présentent deux noyaux ou ont plusieurs nucléoles, et leur taille est 3 à 4 fois celle d'une cellule à l'état normal.

Il y a prolifération réticulo-endothéliale et des infiltrats plasmocytaires.

7.2.3.6.2. - HEPATITE TOXIQUE CHRONIQUE :

Elle est observée chez les rats qui ont reçu la nourriture dont la teneur en sélénium est de 2 ppm. Elle est associée à une pneumonie et à des lésions de la rate, pancréas, coeur et reins.

Il y a modification de l'aspect du foie qui devient dur, fibreux et hypertrophié, et dégénérescence des lobules hépatiques centraux. Les hépatocytes tendent à se vacuoliser. Il y a cytonécrose en différents secteurs du foie, qui prédomine dans la zone centrolobulaire. Il y a prolifération de fibroblastes autour de la veine centrale et à la périphérie des capsules de Glisson.

La prolifération des cellules à l'intérieur du canal biliaire le rend cystique et entraîne la formation de plusieurs conduits séparés par des chaînes de cellules qui vont

s'étendre jusqu'à l'intérieur des lobules hépatiques. La prolifération du système réticulo-endothélial entraîne la formation de granulomes de petite taille à la périphérie des capsules de Glisson. Dans ces granulomes, on trouve des monocytes, histiocytes, lymphocytes, et des cellules plasmatiques.

7.2.3.6.3. - HYPERPLASIE HEPATIQUE :

Cette hyperplasie a lieu chez 50 % des animaux nourris par rations enrichies en sélénium (0,5 ppm) et dont la durée de vie a dépassé 282 jours.

BEL et LEVRAT (28) ont déjà réalisé les expériences sur plusieurs lots de rats intoxiqués de façon chronique au sélénite de sodium administré aux concentrations suivantes : 5, 10 et 15 mg o/oo dans l'eau de boisson. Cependant, aucune cirrhose n'a été observée malgré la durée d'intoxication qui a duré de 72 à 77 jours pour une première série, et 163 jours pour une deuxième.

Macroscopiquement, le foie ne présentait aucune modification d'aspect, de consistance et de taille. Il n'y avait pas d'ascite.

Histologiquement, nécrose et stéatose ont été les seules lésions mises en évidence. La fibrose et les infiltrats inflammatoires étaient discrets.

La stéatose a été observée presque exclusivement chez les animaux intoxiqués à la dose de 10 mg o/oo de sélénium. Elle est très irrégulièrement répartie, mais de préférence située à la périphérie du foie. Au maximum, elle se présente sous forme de volumineuses gouttelettes occupant la presque totalité du protoplasme.

Ces résultats ne sont pas comparables avec les précédents et ceux d'autres auteurs qui ont trouvé des cirrhoses lobulaires véritables. En réalité, la différence tient, selon BEL (28), à l'association d'un régime carencé en protéines, et probablement en vitamine A, dans les expériences aboutissant à la cirrhose. Ainsi, certaines cirrhoses dites "au sélénium" sont en réalité des cirrhoses mixtes, toxiques et diététiques.

7.2.3.7. Téguments :

DUDLEY (100) a étudié le passage de l'oxychlorure de sélénium à travers la peau et a démontré ses propriétés vésicantes.

PALMER (301) a étudié l'action épilatoire de la sélénocystathionine chez la souris.

ROSENTHAL et ADLER (342) ont démontré l'action corrosive de shampoing à base de sulfure de sélénium à 2-5 % sur les sourcils et sur les cils, chez les lapins.

7.2.4. - Teneurs toxiques dans les aliments

D.M.L. - D.L. 50 :

L'évaluation de la toxicité chronique, subaiguë et aiguë, de la D.M.L. et de la D.L. 50, dépend étroitement de l'espèce étudiée, de la voie d'administration, de la nature du dérivé et de certaines conditions opératoires difficiles à reproduire.

7.2.4.1. Sélénium total :

ESPECE	TENEURS	EFFETS	REFERENCES
HOMME	0,03 ppm	carence physiologique	(164)
	0,40 ppm	physiologique pathologique	
	3,0 ppm	pathologique clinique	
	20,0 ppm	clinique mortelle	
	3-4 ppm	limite de toxicité	(78)
	5,0 ppm	dangereuse	
	0,5 ppm/lait	dangereuse	
	15-25 ppm	toxicité subaiguë	
RAT	1,0 ppm	chronique	(313)
CHEVAL	44,0 ppm	chronique	
RUMINANTS	0,5-1,0 mg/kg/j	chronique	

7.2.4.2. Séléniate de sodium :

VOIE D'ADMINISTRATION	D.M.L. mg/kg	D.L.50 mg/kg	ESPECE	REFERENCES
ORALE	-	5,3	rat	(313)
	4,0	-	lapin	
	-	4,2	souris	
INTRA-VEINEUSE	-	3-4	rat	(313)
	4,3	-	rat	(120)
	1,1	-	lapin	(120)
INTRA- PERITONEALE	3,75	-	rat	(120)

7.2.4.3. Dioxyde de sélénium :

VOIE D'ADMINISTRATION	D.M.L. mg/kg	D.L.50 mg/kg	ESPECE	REFERENCES
ORALE	4,4	-	mouton	(313)
SOUS-CUTANEE	2,2	-	mouton	(313)

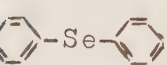
7.2.4.4. Sélénite de sodium :

VOIE D'ADMINISTRATION	D.M.L. mg/kg	D.L.50 mg/kg	ESPECE	REFERENCES
ORALE	-	7,15	souris	(313)
	2,2	-	cheval	(313)
	9,0	-	bétail	(313)
	15,0	-	porc	(313)
	4,0	-	lapin	(313)
	-	3,2	rat	(313)
		7,08-7,75	rat ♂	(318)
		10,5-13,19	rat ♀	(318)
		5,06	cobaye	(175)
		2,25	lapin	(175)

7.2.4.4. Sélénite de sodium (suite) :

VOIE D'ADMINISTRATION	D.M.L. mg/kg	D.L.50 mg/kg	ESPECE	REFERENCES
INTRA-MUSCULAIRE		0,45	agneaux	(124)
INTRA-VEINEUSE	5,7	-	rat	(120)
	0,9	-	lapin	(120)
	-	3,0	rat	(313)
	-	0,875-1	chien	(174)
	1,5	-	lapin	(313)
	2,2	-	mouton	(313)
SOUS-CUTANEE	1,2-2,0	-	porc	(298)
	0,6-0,9	-	chien	(313)
	2,2	-	mouton	(313)
	1,5	-	lapin	(313)
INTRA- PERITONEALE	2,5	-	rats	(120)

7.2.4.5. Autres dérivés :

	VOIE D'ADMINISTRATION	D.M.L. mg/kg	D.L.50 mg/kg	ESPECE	REFERENCES
$\begin{array}{c} \text{Se} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{NH}_2 \end{array}$	ORALE	-	50	rat	(81)
	ORALE	-	360	rat	(81)
SeS ₂	ORALE	-	3.700	souris	(175)
SeS ₂	ORALE	-	138	rat	(81)

7.3. EFFETS SPECIAUX -

7.3.1. - Sélénium et caries dentaires :

HADJIMARKOS (147, 148) a relaté l'évidence épidémiologique croissante chez l'homme dans les Etats de Wyoming et d'Oregon aux Etats-Unis, et expérimentale chez l'animal (le rat), indiquant que le sélénium augmente la susceptibilité à la carie dentaire, surtout s'il est consommé au cours de la période de développement des dents.

En effet, il a noté l'existence d'une corrélation étroite entre la susceptibilité à la carie et les teneurs en sélénium des oeufs et des produits laitiers consommés par l'homme. La teneur de l'eau en sélénium était la même dans toutes les régions étudiées, sélénifères ou non ; il en a conclu que l'eau ne constitue pas la source principale de sélénium pour l'homme.

7.3.1.1. Mécanisme d'action :

Dans le but de connaître le mécanisme d'action du sélénium absorbé soit pendant la période de développement dentaire (effet systémique), soit après la sortie des dents (effet local), un certain nombre d'études ont été réalisées.

7.3.1.1.1. - PERIODE DE DEVELOPPEMENT DENTAIRE :

BUTTNER (53) a administré du sélénite de sodium dans l'eau de boisson à deux groupes de rats femelles pendant toute la période de gestation et à leur portée, à un taux de 2,3 et 4,6 ppm, respectivement. Les résultats indiquent que les rats qui ont été exposés au sélénium pendant toute la période de développement dentaire intra-utérine et post-natale présentent, d'une manière significative, plus de caries que le groupe témoin : 36 et 62 %, respectivement. L'étendue des lésions était, respectivement, 61 et 117 % plus importante.

BOWEN (37), en 1972, a étudié l'action du séléniat de sodium, additionné à l'eau à un taux de 2 ppm, sur la susceptibilité à la carie dentaire chez le singe *Macaca irus*. L'expérimentation a duré 5 ans et le taux de sélénium a été réduit à 1 ppm 3 mois après le début du traitement, à la suite de l'apparition de symptômes toxiques. Au bout de 5 ans, les singes ont développé 2 fois plus de caries dentaires que le groupe témoin, le développement des caries a été aussi beaucoup plus rapide.

7.3.1.1.2. - PERIODE POST-ERUPTIVE :

Les résultats observés par différentes équipes sont contradictoires (151). Ceci est dû au fait que le développement de la carie chez l'animal en cours d'expérimentation est influencé par un grand nombre de facteurs variables.

En 1967, HADJIMARKOS (149) a réussi à montrer que l'addition de sélénium à l'eau de boisson diminue aussi bien l'ingestion d'aliments solides que celle de l'eau et accroît le rapport aliments solides / eau chez le rat, ce qui provoque un retard dans le rinçage des particules qui restent sur les dents et accélère la carie.

SHEARER (378), en 1974, a étudié plus en détail les modifications observées à la suite de l'addition de sélénium à l'eau de boisson. L'étude a été réalisée sur 16 rats mâles. La teneur en sélénium de l'eau de boisson était de 3 ppm. L'expérience a duré 19 jours, au cours desquels la température a été maintenue constante à 22°C.

Le sélénium diminue la quantité d'aliments ingérés de 27 %. Ceci est dû à une diminution du nombre de prises d'aliments de 19 %, entraînant une chute de poids de 19 % aussi. Le temps nécessaire à chaque ingestion augmente de 30 %, et le taux d'ingestion (minute/g) de 39 %.

L'absorption de l'eau est réduite de 28 %, due, elle aussi, à une diminution du nombre de prises de 32 % et à une augmentation du temps d'ingestion liquidienne.

BEL et son équipe (28) ont repris les expériences chez les rats qui ont été intoxiqués de façon chronique par le sélénite de sodium administré aux concentrations de 5, 10 et 15 mg o/oo, dans l'eau de boisson. Ils ont remarqué que l'alimentation est restée stable tout au long de l'expérimentation, présentant de très minimes oscillations autour du chiffre moyen journalier. Par contre, une diminution de la consommation liquidienne est apparue dès la première semaine chez les animaux intoxiqués, et s'est poursuivie tout au long de l'expérimentation. Ils ont même remarqué une proportionnalité entre la concentration en sélénium et la quantité de boissons ingérée.

7.3.1.1.3. - MECANISME D'ACTION PROPREMENT DIT :

7.3.1.1.3.1. Période de développement dentaire :

Le sélénium est capable d'être incorporé dans la fraction protéique de plusieurs tissus. Il est capable de remplacer le soufre dans certains acides aminés : sélénocystine et sélénométhionine.

SHEARER et HADJIMARKOS (379) ont administré à 4 rats femelles, à 4 reprises, du sélénite de sodium radioactif entre le dixième et le dix-neuvième jour de la période de gestation. 13 jours après la naissance, les rats femelles et leurs portées ont été sacrifiées, et la radioactivité des différents tissus a été dosée.

Les molaires, incisives et mandibules, des rats qui venaient de naître, contenaient beaucoup plus de Se^{75} que celles des rats adultes. L'émail et la dentine avaient la

plus forte radioactivité, 70 % de la radioactivité de l'émail et 95 % de celle de la dentine étaient liées à la fraction protéique.

7.3.1.1.3.2. Période post-éruptive :

L'action locale est due à l'altération du rapport aliments solides / eau. La diminution de la consommation liquidienne est due :

- selon SHEARER et HADJIMARKOS, à des phénomènes de répulsion sensorielle vis-à-vis du sélénium ;
- selon BEL, il s'agit de facteurs métaboliques non encore identifiés.

7.3.1.2. Sélénium et fluor :

HADJIMARKOS (150) a démontré que le sélénium et le fluor, antagoniste typique de la cariogénèse, ne semblent pas influencer l'un sur l'autre, contrairement à ce qui a été démontré au préalable par MOXON et DUBOIS (273). Le fluor ne perturbe pas l'élimination du sélénium, et ce dernier ne paraît pas diminuer le dépôt du fluor sur les os et les dents. Ceci a été observé chez deux lots de rats qui ont reçu une nourriture contenant 3 ppm en sélénium pendant 4 semaines. L'un des deux lots a reçu simultanément du sélénium à 50 ppm dans l'alimentation.

7.3.2. - Effet tératogène :

L'effet tératogène du sélénium a été longuement discuté. Il semble que, à l'heure actuelle, à teneur physiologique normale, le sélénium est dénué de toute toxicité.

TABOURY (409) a démontré que les poules nourries avec des graines toxiques donnent des oeufs fertiles qui n'éclosent pas après incubation, dans la proportion de 75 %, car les embryons sont malformés : ceux-ci possèdent un seul oeil centré sur le bec, le bec supérieur est très court, tandis que le bec inférieur est plat et mince, les ailes sont absentes, les pattes sont courtes et souvent terminées par un seul doigt.

Chez l'homme, ROBERTSON (332) a montré le rôle tératogène du sélénium à la suite de l'observation de malformations génitales et de l'interruption de certaines grossesses. En effet, dans son laboratoire, pendant une période de 5 ans, chez plusieurs techniciennes exposées au sélénium (utilisé pour la préparation d'un milieu de culture pour les salmonelles), il a observé plusieurs interruptions de grossesses et une grossesse qui a donné naissance à un enfant malformé avec atteinte bilatérale des membres inférieurs, les teneurs urinaires ne dépassaient pas cependant la valeur normale.

HOLMBERG et FERM (183) n'ont pas réussi à confirmer le rôle tératogène du sélénite de sodium chez les hamsters auxquels ils ont administré une dose de 2 mg/kg le huitième jour de la période de gestation, et ont mis en évidence le rôle protecteur vis-à-vis du pouvoir tératogène de l'arséniate de sodium et du sulfate de cadmium séparément.

Plus tard, SHAMBERGER (372), en 1971, a étudié le taux de mortalité néo-natale des différentes régions des Etats-Unis, en fonction de la répartition géographique du sélénium et de ses teneurs sanguines. Le taux de mortalité est inversement proportionnel à la teneur en sélénium. Ces résultats confirment les observations de HOLMBERG chez le hamster, le rôle nutritif d'oligo-élément, et écartent tout risque de tératogénicité chez l'homme.

7.3.3. - Effet cancérigène :

Aussi bien pour le sélénium que pour les autres dérivés chimiques, il est difficile d'évaluer le risque cancérigène dont l'évaluation repose sur :

- des enquêtes épidémiologiques ;
- des expériences menées sur différentes espèces d'animaux, des cultures de tissus et des tests de mutagénicité.

7.3.3.1. Expérimentation humaine et animale :

Administré pendant une longue durée, le sélénium a été considéré, chez les animaux, comme une substance cancérigène. A l'origine de cette observation, ont été les travaux de NELSON, FITZHUGH et CALVERY, en 1943 (281).

L'étude a été réalisée sur 144 rats, dont 18 témoins, tous nourris par rations contenant 12 % de protéines et constituées de grains de blé (44 %), de céréales (49 %), de levure (3 %) et d'huile de foie de morue (1 %), additionnées de carbonate de calcium et de chlorure de sodium à 1 %, et d'extrait de foie lyophilisé. Des rats femelles âgés de 3 semaines ont été utilisés car ils sont plus sensibles que les mâles.

Chaque lot a reçu une nourriture de teneur différente en sélénium : 5, 7 et 10 ppm, respectivement :

- soit sous forme organique, et cela à la suite de l'addition à la nourriture de grains sélénifères dont la teneur en sélénium a été déterminée au préalable ;
- soit sous forme inorganique : solution de sélénure d'ammonium et de potassium à 48 g/litre.

Le taux de mortalité au cours des 18 premiers mois était proportionnel à la teneur en sélénium. Chez les 73 rats morts ou sacrifiés au bout de ce temps, plusieurs cirrhoses nodulaires ont été observées, accompagnées d'atrophies, d'hyperplasies et de dilatation des sinusoides.

Les rats qui ont vécu au-delà de cette période, jusqu'au vingt-quatrième mois, ont développé une atteinte de type chronique, non accompagnée de cirrhose ou d'hémorragie intra-hépatique. Parmi les 53 rats, 11 avaient des tumeurs hépatiques, 4 autres ont montré une hyperplasie adénomatoïde avancée, susceptible d'évoluer en cancer.

En 1949, CLAYTON et BAUMANN (73) ont repris les travaux de NELSON sur les rats pesant en moyenne 200 g et nourris par rations pauvres en sélénium, contenant 12 % de caséine, pauvres en niacine et en acide folique. Durant les 4 premières semaines, les rats ont reçu une nourriture additionnée de m-DAB (m-méthyl-para-diméthyl-amino-azo-benzène) à 0,064 %, puis pendant les 4 semaines qui ont suivi, une nourriture supplémentée en sélénium (5 ppm) sous forme de sélénite de sodium, puis de nouveau, pour une même durée, la nourriture enrichie en m-DAB.

Huit semaines après, pendant lesquelles les rats ont été nourris par la ration pauvre en sélénium, 62 % des rats qui n'avaient pas reçu du sélénium à 5 ppm dans leur nourriture ont développé des tumeurs hépatiques, alors que parmi les animaux qui avaient reçu la nourriture enrichie en sélénium, seuls 31 % étaient cancéreux.

Ces résultats contradictoires ont attiré l'attention, à cette époque, sur le rôle joué par le sélénium dans le développement des tumeurs hépatiques.

Selon WEISBERGER et SUHLAND (438), l'inhibition du développement des tumeurs est associée à un blocage des groupements SH libres. Il en est ainsi pour la sélénocystine qui inhibe l'incorporation de la cystine dans les leucocytes leucémiques. En effet, la sélénocystine diminue la croissance des tumeurs chez l'animal. Afin de vérifier cette hypothèse, des cellules tumorales ont été injectées à 36 rats mâles de poids moyen : de 175 à 200 g. Ces rats ont reçu quotidiennement, et cela pour une durée de 14 jours, 1 mg de sélénocystine par kilo, par voie intra-péritonéale, 21 jours après l'inoculation des cellules tumorales, les tumeurs couvraient une surface de 8 cm². 8 jours après le début du traitement, aucun développement de la tumeur n'a été observé, alors que chez les 15 rats qui ont servi de contrôle, les tumeurs ont continué à croître pour atteindre 30 cm² au bout du vingtième jour.

Ces observations ont incité WEISBERGER et SUHLAND (438), en 1956, à tester la sélénocystine chez deux patients souffrant d'une leucémie aiguë, et deux autres d'une leucémie myéloïde chronique. 100 mg de sélénocystine ont été administrés quotidiennement, pendant une durée de 57 jours. Chez ces patients, la sélénocystine a entraîné une réduction marquée du nombre de leucocytes prématurés circulant. L'effet est moins marqué sur les leucocytes arrivant à maturité. Tout ceci

a été accompagné d'une réduction du volume de la moelle épinière et d'une amélioration de l'état des malades. Il a été observé cependant des nausées et des vomissements qui ont amené ces auteurs à arrêter le traitement. C'est la seule raison pour laquelle la thérapeutique aux dérivés sélénisés a été abandonnée, sans avoir les moyens d'étudier la possibilité d'une rémission totale ou partielle.

A la suite de l'étude et de la mise en évidence des propriétés antioxydantes du sélénium, l'effet anticancérigène du sulfure de sélénium vis-à-vis de l'huile de croton a été testé. SHAMBERGER et RUDOLPH (375) ont badigeonné les corps de souris âgées de 55 à 60 jours avec du 7-12-diméthylbenzanthracène. Chaque souris a reçu, en une seule fois, une dose de 125 µg de ce produit dissous dans l'acétone. 3 semaines après, 5 de ces souris ont été badigeonnées, 5 fois par semaine et pour une durée de 16 semaines, avec 0,25 ml d'un mélange : huile de croton à 0,033 % et séléniure de sodium à 0,0005 %. Au bout de 6 semaines, 9 tumeurs ont été observées, alors que chez celles qui ont été badigeonnées avec l'huile de croton seulement, le nombre de tumeurs observées a été évalué à 132. Lorsque le séléniure de sodium a été remplacé par le D.L. alpha-tocophérol, le nombre de tumeurs était de 50. L'hydrocortisone et le cystéamide étaient aussi inefficaces que l'alpha-tocophérol ; la vitamine C et la chloroquine se sont montrées inefficaces (375).

Ces résultats ont été confirmés plus tard par RILEY (331) qui, à la place de l'huile de croton, a utilisé un dérivé A₁, isolé à partir de cette même huile et tenu responsable de l'effet promoteur et initiateur (cocarcinogène) chez les animaux prétraités avec un dérivé cancérigène.

MAUTNER et JAFFE (263) ont démontré que la 6-séléno-purine est aussi active que la 6-mercaptapurine dans l'inhibition du développement de ces symptômes. Plus tard, en 1963, ces mêmes auteurs ont confirmé le rôle antitumoral de la 2-amino-6-séléno-purine.

Cependant, les chercheurs russes, VOLGAREV et TSCHERKES (430), en 1967, ont réaffirmé l'effet cancérigène du sélénium administré sous forme de séléniure de sodium aux rats. Dans une première expérience, 40 rats ont été nourris par rations contenant 12 % de caséine et 0,43 mg de sélénium (séléniure de sodium) pour 100 g. Aucune indication n'a été fournie sur l'âge et le poids corporel des animaux au début du traitement. A l'âge de 18 mois, 23 rats étaient encore vivants, dont 10 présentaient des lésions tumorales, et 4 autres des lésions précancéreuses. Malheureusement, l'expérimentation ne comprenait pas un groupe témoin recevant la ration basale sans sélénium. Aucune indication n'a été fournie sur le moment d'apparition des tumeurs.

Une deuxième expérience a été réalisée sur 60 autres rats, pour une période de 6 mois pendant laquelle ils ont reçu la même nourriture décrite ci-dessus. Au bout de ce temps, les rats ont été divisés en trois groupes :

- 1^{er} groupe de 20 : a reçu une nourriture contenant 0,86 mg Se/kg.
- 2^{ème} groupe de 20 : même nourriture que le 1^{er} groupe, mais enrichie en caséine à 30 %.
- 3^{ème} groupe de 20 : même nourriture que le 2^{ème} groupe, renfermant en outre de la riboflavine.

16 de ces animaux ont vécu plus d'un an, dont 12 plus de 2 ans. Parmi ces 16, un seul avait un cancer du foie et deux autres un sarcome, l'un au médiastin et l'autre au niveau des nodules lymphatiques mésentériques.

Là aussi, il n'y avait pas de groupe témoin.

La troisième expérience a été réalisée sur 100 rats pesant en moyenne 100 g, nourris par rations contenant 0,43 mg de sélénium (séléniate de sodium) pour 100 g. L'addition de méthionine à 0,5 % et d'alpha-tocophérol à 1 %, de cystine à 0,5 %, d'acide nicotinique à 0,5 %, puis de choline à 3,5 %, n'avait aucun effet sur l'incidence des cancers. Aucune tumeur ou lésion précancéreuse n'a été observée, tous les animaux ont été sacrifiés au dix-huitième mois.

HARR et MUTH (162), dont les travaux ont été déjà cités et revus en détail, n'ont pas réussi à affirmer l'effet cancérigène du sélénium lors d'une étude expérimentale réalisée sur 1.126 rats nourris par rations de différentes teneurs en protéines et en sélénium.

SCHROEDER et MITCHENER (356) ont réaffirmé le rôle cancérigène du séléniate de sodium chez les rats auxquels ils ont administré une nourriture enrichie en protéines et renfermant 2 à 3 ppm de sélénium. Ils ont expliqué la différence observée avec les résultats de HARR et MUTH par le fait que ces derniers avaient administré à leurs rats une assez forte teneur en sélénium ($\geq 4,3$ ppm), ce qui avait entraîné une baisse notable de la durée de vie qui était de 419 jours en moyenne. Or, il est évident que l'apparition des tumeurs est fonction de l'âge et de la durée d'administration, aussi bien chez l'homme que chez l'animal. Selon ces auteurs, il est fort probable que ces lésions n'avaient pas eu le temps nécessaire pour évoluer en cancers.

Chez les souris, ni les sélérites, ni les séléniates, n'avaient un effet cancérigène (357).

En 1972, HARR (163) a évalué l'effet antagoniste du sélénium vis-à-vis de la N-2-fluorényl acétamide (FAA), agent d'induction du cancer chez les rats.

7.3.3.2. Enquêtes épidémiologiques :

SHAMBERGER et FROST (374) ont étudié le taux de mortalité due au cancer, aux Etats-Unis, en fonction des teneurs sanguines en sélénium chez les adultes. Ces observations ont été réalisées dans 10 cités américaines dont le nombre d'habitants variait entre 10.000 et 70.000. Ils ont trouvé une corrélation hautement négative ($R = -0,96$) entre ces deux paramètres étudiés avec $P < 0,001$, c'est-à-dire une probabilité inférieure à 1 o/oo pour que l'observation soit attribuée au hasard.

7.3.3.3. Modes d'action :

7.3.3.3.1. - EFFET CANCERIGENE :

Il s'agirait d'une méthylation anormale des acides nucléiques par l'adénosyl sélénométhionine (265).

7.3.3.3.2. - EFFET ANTICANCERIGENE :

Le sélénium agit en tant que antioxydant. En effet, les antioxydants ont des propriétés anticancérigènes, et cela est dû probablement à une protection de l'acide désoxyribonucléique contre les altérations entraînées par le phénomène de peroxydation lipidique : altération de l'ADN, modification de l'information transmise aux cellules filles et de l'information codée nécessaire aux fonctions métaboliques et à leur contrôle durant la vie cellulaire.

SHAMBERGER (373) a confirmé cette hypothèse en observant les chromosomes leucocytaires d'un adulte volontaire, âgé de 38 ans, pendant la métaphase. Pour cela, 15 heures avant l'examen, les leucocytes sont mis en suspension dans de l'albumine bovine additionnée séparément d'antioxydant et d'agent cancérigène.

Comme agent cancérigène, il a utilisé le cyclamate de sodium et le 7-12-diméthyl-benzathracène, et comme antioxydant, il a utilisé l'acide ascorbique, le butyl-hydroxytoluène, le sélénite de sodium et la D.L. alpha-tocophérol. La quantité, exprimée en micromoles de sélénite de sodium, était 50 à 100 fois inférieure à celle des autres antioxydants utilisés. L'altération chromosomique a été réduite respectivement de :

31,7 % acide ascorbique,
63,8 % butyl-hydroxy-toluène
42,0 % sélénite de sodium
et 63,2 % D.L. alpha-tocophérol.

En se basant sur le nombre de micromoles, le sélénium semble être le plus actif.

Certains agents cancérigènes agissent en entraînant la peroxydation lipidique qui entraîne, à son tour, la destruction des membranes cellulaires et la formation d'aldéhyde malonique qui réagit, à son tour, avec l'ADN.

Le rôle joué par le sélénium à ce niveau sera décrit ultérieurement, mais il semble que l'effet anticancérigène ne peut pas être dû complètement à la présence du sélénium dans la glutathion peroxydase. En effet, SHAMBERGER n'a trouvé aucune différence entre les teneurs en GSHPx chez les malades cancéreux et les sujets normaux.

La "Food and Drug Administration" autorise, à l'heure actuelle, l'addition du sélénium uniquement à la nourriture des animaux, et cela dans des conditions strictes qui seront décrites ultérieurement. Son usage, chez l'homme, est strictement interdit.

8. TRAITEMENT

8.1. TRAITEMENT PREVENTIF -

En milieu industriel, l'accent doit nécessairement être mis sur la prévention, et des programmes de surveillance des ambiances professionnelles doivent être élaborés afin d'exercer un contrôle rigoureux de la santé des travailleurs. L'aménagement des lieux de travail doit aussi être pris en compte (18, 216).

8.1.1. - Programme de surveillance des employés exposés au sélénium et à ses dérivés :

Ce programme a été proposé par LACASSE et RICHER, respectivement Consultant et Chef du Service de Toxicologie à l'hôpital Santa Cabrini à Montréal.

8.1.1.1. Examen de préembauche :

Il s'agit d'un examen complet, majeur, comportant : les antécédents personnels héréditaires et les habitudes individuelles ; l'histoire professionnelle : poste de travail, cadences, rotations, les accidents de travail avec ou sans séquelles et les maladies et/ou intoxications professionnelles ; l'anamnèse et la revue détaillée de toutes les fonctions physiologiques, en insistant sur les troubles dûs aux substances chimiques impliquées ; un examen général complété par une investigation radiologique (radiographie pulmonaire), électrique (ECG chez les sujets âgés de 40 ans et plus, ou sur indication) et biologique (hémogramme, analyses des urines, transaminases SGOT - SGPT, phosphatase alcaline et dosage du sélénium urinaire).

Les sujets ayant subi cet examen de préembauche sont revus 4 à 6 semaines plus tard. Les résultats des examens sont évalués, le diagnostic final posé et des recommandations formulées.

Devront être écartés de l'exposition au sélénium (18, 216), les sujets porteurs :

- de dermite atopique ;
- d'allergies cutanées et des voies respiratoires supérieures (rhume des foins) ;
- de troubles hépatiques constitués (stéatose et/ou cirrhose de toute étiologie, hépatite en voie de guérison - 3-6 mois -, alcoolisme chronique) ;

- de neurasthénie chronique, syndrome anxio-dépressif patent ;
- de troubles pulmonaires chroniques (bronchite, emphysème, asthme) ;
- de troubles rénaux chroniques (insuffisance rénale chronique, néphrite chronique) ;
- de troubles digestifs chroniques (ulcère gastro-duodéal, gastrite).

8.1.1.2. Examen trimestriel :

Les sujets exposés au sélénium doivent être examinés tous les trois mois : système nerveux, O.R.L., vue, fonctions digestive, pulmonaire. Le dosage du sélénium urinaire complète ce bilan. A côté de ceci, on doit procéder à un contrôle de l'hémogramme et de la fonction hépatique (SGOT, SGPT).

8.1.1.3. Examen mensuel :

Les sujets présentant les anomalies cliniques et biologiques suivantes devront être revus sur une base mensuelle, et éventuellement retirés de l'exposition :

- tableau clinique d'imprégnation séléniée : anamnèse et examen accompagné d'une élévation progressive du sélénium urinaire ($> 0,1$ mg/litre) ;
- les modifications des paramètres de la fonction hépatique (SGOT, SGPT) accompagnées d'une élévation du sélénium urinaire ($0,2 - 0,5$ mg/litre) entraîneront la cessation immédiate de l'exposition et exigeront une investigation médicale complète. Le Directeur du service de santé de l'usine (Canada) sera avisé des résultats de ce bilan et de l'évolution de l'intoxication. Aucun employé reconnu comme intoxiqué ne pourra regagner son poste de travail avant guérison complète, c'est-à-dire normalisation du sélénium urinaire, correction des paramètres hépatiques et disparition de la symptomatologie clinique. De plus, les conditions de l'environnement du poste alors occupé devront être corrigées si elles s'avèrent d'emblée reliées directement à la maladie. En attendant, l'ouvrier devra être muté à un autre département après concertation avec le Directeur médical de l'usine, le Médecin traitant et le Directeur du service (Canada).

8.1.2. - Aménagement des lieux de travail :

Les mesures de prévention énumérées ci-après ont toutes pour objet d'empêcher des poussières irritantes et solubles d'entrer en contact avec la peau, les yeux, les poumons et l'estomac des travailleurs. Les principes sont

les mêmes que pour tous les risques analogues :

- 1) Détermination atmosphérique du sélénium visant à maintenir la concentration aérienne du métalloïde et de ses dérivés au-dessous de la concentration maximale admissible. Cette dernière varie avec la nature du dérivé et le pays :

. Sélénium métalloïde.....	0,2 mg/m ³	(U.S.A.)
	2,0 mg/m ³	(U.R.S.S.)
. Dioxyde de sélénium.....	0,1 mg/m ³	(U.R.S.S.)
	0,2 mg/m ³	(U.S.A.)
. Hydrogène sélénié.....	0,05 ppm	(U.S.A.)
	0,3 mg/m ³	(G.B.)
	0,2 mg/m ³	(U.R.S.S.)
- 2) Bonne ventilation et aspiration d'au moins 2,6 m³ d'air par minute pour tous les postes où on manipule les dérivés du sélénium, notamment l'H₂Se et le SeO₂.
- 3) Equipement de protection individuelle : la manipulation directe du sélénium et de ses dérivés doit amener le sujet exposé à porter des gants, un tablier et un masque protecteur filtrant, afin de lui assurer le maximum de protection, surtout si certaines opérations sont exécutées loin des bouches d'aération, et spécialement dans un espace confiné. Le port de verres protecteurs s'impose surtout si l'ouvrier manipule des dérivés liquides (solution d'oxyde hydrosoluble ou d'oxychlorure).

Lors des opérations de nettoyage des gaines de ventilation ou des appareils destinés à récupérer le sélénium (rosters), un masque avec amenée d'air ou un casque alimenté en surpression doivent être utilisés.
- 4) La manutention, mécanisée au maximum, doit se faire à la plus grande distance possible.
- 5) Interdiction de fumer, de boire ou de manger, aux postes de travail pendant les opérations et avant toute toilette personnelle.
- 6) Installation de réfectoires, de douches et de vestiaires, à l'écart de bâtiments où l'on utilise le sélénium.

8.2. THERAPEUTIQUE -

8.2.1. - Traitement local :

8.2.1.1. Peau : brûlures :

Les brûlures sont rarement graves (troisième degré) et si elles sont traitées comme il convient, guérissent sans laisser de cicatrice. Toutes les parties brûlées doivent être lavées à l'aide d'une solution aqueuse de thiosulfate de

sodium à 10 %. Ce traitement provoque, par réduction, la transformation immédiate de l'anhydride sélénieux incolore et irritant en sélénium rouge inoffensif et indolore. Après ce lavage initial, il faut appliquer une crème contenant 10 % de thiosulfate de sodium. Il n'y a de cicatrice qu'en cas d'infection secondaire de la brûlure.

D'autres auteurs ont préconisé un lavage abondant à l'eau suivie d'une solution ammoniacale de bicarbonate de sodium.

8.2.1.2. Ongles :

Le meilleur traitement consiste à couper les ongles au ras et à les brosser à l'eau savonneuse pendant 5 minutes, puis, à l'aide d'un bâtonnet, à introduire sous l'ongle la crème au thiosulfate de sodium. Généralement, ce traitement apaise complètement la douleur.

8.2.1.3. Yeux :

Si l'anhydride sélénieux pénètre dans les yeux, il faut immédiatement laver abondamment à l'eau pure. Cela irrite les yeux mais, appliqué immédiatement, le traitement prévient généralement l'apparition d'une conjonctivite.

Les picotements provoqués par le dioxyde de sélénium disparaissent rapidement si l'on applique un onguent à 10 % de thiosulfate de sodium.

8.2.1.4. Oedème pulmonaire :

Le traitement consiste surtout à rassurer le malade et à lui administrer de l'oxygène pendant une heure. C'est le seul traitement préventif. On administre aussi des diurétiques, des antibiotiques et de l'hydrocortisone par voie intraveineuse.

8.2.2. - Traitement général :

SMITH en 1939, et autres (238, 416), ont étudié l'effet protecteur des protéines vis-à-vis de la toxicité chronique du sélénium.

L'addition de méthionine à 0,5 % et de D.L. alphatocophérol sous forme d'acétate à 0,01 - 0,05 % à l'alimentation des rats a permis de protéger ces derniers contre l'effet toxique du séléniate de sodium présent à une teneur de 10 à 20 µg/g dans la nourriture (235).

Une nourriture riche en protéines ou supplémentée en méthionine, bêtaïne, ou choline, permet de protéger expérimentalement contre la sélénose chronique (211).

Certains ont préconisé l'administration de la vitamine C à la suite des travaux de SVIRBELEY en 1938 (407). SVIRBELEY a démontré l'existence d'une relation entre le sélénium et la vitamine C. Les animaux intoxiqués par le sélénium présentaient une diminution nette de la teneur en vitamine C, aussi bien du foie que des surrénales. Cependant, l'administration de la vitamine C n'améliore pas l'état général et ne contribue pas à contrecarrer l'effet toxique du sélénium.

AMDUR (13), en 1948, a suggéré l'utilisation de l'acide ascorbique à raison de 10 mg/kg. De toute façon, cette thérapeutique semble inefficace sans cessation de l'exposition.

L'emploi du BAL (British anti-lewisite) a été prôné par le même auteur lors d'intoxications aiguës, mais son utilisation a été par la suite déconseillée par ce dernier après des expérimentations animales où il a démontré son caractère néphrotoxique.

L'usage de l'iodure de potassium a été proposé par ROSENFELD et BEATH en 1947. Cependant, il augmente l'effet toxique du sélénium.

SIVJAKOV et BRAUN (391) ont réussi à réduire l'intoxication aiguë au sélénite de sodium chez les rats par administration du sel disodique de l'acide éthylène diamine tétra-acétique. L'administration doit être effectuée dans les 15 minutes qui suivent l'absorption du sélénite.

HALVERSON et MONTY (156) ont réalisé une inhibition partielle du phénomène d'intoxication par le sélénite et le séléniat de sodium, chez les rats, par addition de sulfate de sodium ou de potassium à leur nourriture.

9. ROLE NUTRITIONNEL DU SELENIUM

9.1. INTRODUCTION -

Bien que l'apport en sélénium dans la nourriture pour le maintien des animaux en bonne santé ait été reconnu nécessaire il y a quelques années, et bien que plus d'une quarantaine d'espèces animales aient montré des syndromes de carence lors d'un apport insuffisant, le sélénium n'a pas été reconnu comme oligo-élément nécessaire chez l'homme par la "Food and Nutrition Board". Les études et les observations faites chez les enfants confirment bien cette nécessité.

Les symptômes observés lors d'une carence en vitamine E et/ou en sélénium sont nombreux et seront vus ultérieurement. L'histoire de l'interaction sélénium - vitamine E remonte à 1951, lorsque SCHWARZ (360) a observé que les rats nourris de protéines et de levures (du genre *Torula*) présentaient une nécrose du foie. Cette lésion pouvait être prévenue par de la cystine, vitamine E, et par une troisième substance inconnue mais présente dans la caséine et la levure. Cette substance a été appelée "Facteur 3" et a été l'objet de nombreuses études.

En 1957, SCHWARZ et FOLTZ (363, 364) ont démontré le rôle préventif du sélénite de sodium dans la nécrose du foie chez les rats et la diathèse exsudative des poussins. PATTERSON (307) a conclu, après diverses expérimentations, que le sélénium peut remplacer la vitamine E dans la prévention de la diathèse exsudative du poussin. Le sélénite, comme la séléénométhionine, est 500 à 1.000 fois plus actif que l'alpha-tocophérol contre les lésions du poussin.

La nécrose du foie du rat et la diathèse exsudative étaient considérées comme étant des maladies de carence en sélénium. La découverte du rôle préventif de cet élément a suscité de nombreuses questions sur le rôle joué aussi bien par le sélénium que par la vitamine E.

9.2. LES SYNDROMES DE CARENCE -

9.2.1. - Chez l'animal :

9.2.1.1. Dystrophie musculaire d'origine nutritionnelle :

9.2.1.1.1. - FORME CLINIQUE :

9.2.1.1.1.1. Définition :

Il s'agit d'un syndrome d'origine nutritionnelle, d'allure enzootique, caractérisé cliniquement par des symptômes locomoteurs et cardio-respiratoires, anatomiquement par des lésions dégénératives des muscles squelettiques et du myocarde, qui atteint les veaux, les moutons, les pou-lains, les lapins, les porcs et les poussins (102).

9.2.1.1.1.2. Synonymie :

Cette maladie, qui a fait l'objet de nombreuses publications, a eu un grand nombre d'appellations qui montrent bien l'intérêt qu'elle suscite. Ces appellations ont été déterminées par :

- l'aspect macroscopique des lésions : "viande de poisson", "viande de poulet", "viande blanche" et "maladie des muscles blancs" (white muscle disease = WMD*) ;
- l'anatomie pathologique : myopathie dégénérative, myopa-thie dépigmentaire, dystrophie musculaire d'origine nutritionnelle = DMN* (nutritional muscular dystrophy = NMD) ;
- les symptômes : maladie du "raide", paraplégie enzootique des veaux, myosite des veaux, syndrome myopathique, dyspnée des veaux de lait.

9.2.1.1.1.3. Rôle étiologique du sélénium et de la vitamine E :

En 1927, AGDUHR (3) a réussi à reproduire cette maladie chez les veaux en leur administrant de l'huile de foie de poisson. Une quinzaine d'années plus tard, DAM (83) a démontré que la toxicité de l'huile de foie de poisson est due à sa concentration élevée en acides gras insaturés (AGI). Bien que la DMN expérimentale ait été provoquée par l'administration d'AGI, il est évident que le rôle joué par les AGI est négligeable dans l'étiologie de la DMN, souvent spontanée et se déclarant d'une manière enzootique, frappant le bétail et les animaux de ferme. Ainsi, GARTON (132), en 1956, a écarté définitivement cette hypothèse, et cela à la suite de la détermination des teneurs en AGI du lait de vache provenant d'un troupeau dont les veaux souffraient de DMN.

*Appellations les plus courantes. On retiendra la DMN.

L'administration de la vitamine E permettait de prévenir l'apparition de la DMN expérimentale induite par l'administration de fortes doses d'AGI subissant le phénomène d'auto-oxydation. Or, comme la DMN spontanée frappant les moutons et les veaux était aussi guérie à la suite de l'administration de vitamine E, la DMN a été déclarée ainsi : "maladie d'origine nutritionnelle" dont l'apparition est imputable à une carence en vitamine E.

HOUCHIN (185) a tenté d'expliquer le rôle préventif de la vitamine E. Selon lui, la vitamine E est active sous forme de phosphate de tocophérol dans la contraction musculaire. La molécule cède son phosphate à la créatine pour donner de la phospho-créatine (le taux de la créatine diminue dans l'avitaminose E), ou à l'ADP pour donner l'ATP et permettre ainsi un renouveau temporaire de l'activité du muscle. Une carence en vitamine E peut empêcher la synthèse de la phospho-créatine indispensable à la contraction musculaire.

En 1957, BLAXTER (33) a refusé de considérer que la carence en vitamine E soit la cause primordiale de la DMN, mais il n'a pas nié qu'une thérapeutique à base de vitamine E permettrait de prévenir son apparition. Plus tard, il a démontré que cette prévention n'était possible qu'en présence d'un excès de vitamine E (293), expliquant ainsi certains échecs rapportés (277).

A la suite de la découverte de SCHWARZ et FOLTZ (364) chez le rat, le sélénium a été utilisé dans le traitement de la DMN. L'importance du rôle du sélénium dans la prévention de la DMN est confirmée par la détermination des teneurs en sélénium des organes d'animaux carencés. Chez ces derniers, les teneurs sont beaucoup plus faibles que chez les animaux en bonne santé. Ces mesures comparatives ont été réalisées par HARTLEY et GRANT en 1961 (166) et par LINDBERG en 1965 (240).

La très faible teneur en sélénium des fourrages des régions non sélénifères où la DMN est souvent observée confirme l'hypothèse précédente. Ceci a été observé en Finlande, Australie, Suède, France et Nouvelle-Zélande.

9.2.1.1.1.4. Symptomatologie :

La maladie frappe surtout les sujets jeunes, âgés de quelques jours à quelques mois. Elle apparaît aussi chez les adultes, mais ceci est rare. Elle sévit avec une acuité particulière au printemps, mais il n'est pas rare de la rencontrer toute l'année. Elle est caractérisée par :

- les signes locomoteurs : les signes les plus communs sont l'impotence fonctionnelle, la difficulté ou l'impossibilité à rester en station debout. Lors de la station debout, l'animal garde le dos légèrement voûté, la queue relevée en position de miction. Souvent, l'animal présente des tremblements de tous ses muscles, et parfois de tout son corps ;

- les signes cardio-respiratoires : la polypnée est habituelle, elle peut être précoce et peut même précéder l'apparition des symptômes locomoteurs. Elle est associée à une tachycardie, traduisant une myocardite d'un pronostic excessivement sombre. A l'auscultation, il y a affaiblissement des bruits du coeur et de l'arythmie. Ces signes sont rencontrés le plus souvent chez les sujets jeunes (292). Les signes locomoteurs et cardio-respiratoires coexistent le plus souvent ;
- les troubles généraux et digestifs : il y a anorexie, entraînant un retard de la croissance. Dans la forme subclinique, c'est le seul symptôme observable. La diarrhée est un signe aussi important.

9.2.1.1.1.5. Evolution :

En général, la maladie évolue vers la mort d'autant plus rapidement que les signes cardio-respiratoires prédominent. La mort peut même survenir en quelques heures.

Par contre, si les symptômes locomoteurs prédominent, l'évolution est plus lente, mais apparaissent alors des complications de diarrhée, d'oedème pulmonaire, de broncho-pneumonie avec élévation thermique.

9.2.1.1.1.6. Lésions :

- Lésions macroscopiques : il s'agit d'une dégénérescence musculaire caractérisée par la distribution symétrique des lésions. Ceci permet de faire la distinction avec la dégénérescence locale causée par des fractures ou des contusions.

L'attention est immédiatement attirée par la couleur du muscle qui varie du rose pâle au blanc et la présence de travées blanchâtres justifiant l'appellation de maladie des "muscles blancs" ou des "veaux marbrés".

Les muscles les plus atteints sont ceux de la racine des membres, de la croupe, des lombes, du diaphragme et des intercostaux.

Le myocarde présente également cette couleur pâle et marbrée, et le coeur accuse souvent une certaine dilatation.

- Lésions microscopiques : la lésion primitive est une dégénérescence cireuse de la fibre musculaire. Toutes les fibres ne sont pas uniformément atteintes, certaines seulement présentent des lésions.

9.2.1.1.1.7. Modification de certains paramètres biochimiques :

- Augmentation du taux de potassium urinaire due à une libération du potassium par les muscles.
- Il en est de même pour la créatine dont une partie sera libérée. Par suite, le rapport urinaire créatine/créatinine va augmenter (22, 219).

- La SGOT subit des variations. En effet, au cours de la dégénérescence, la SGOT est relâchée en partie par les muscles. BLINCOE et DYE (34) considèrent que la valeur de la SGOT retrouvée est proportionnelle à l'étendue des lésions musculaires.

L'augmentation peut être cependant modérée lors d'une atteinte subaiguë ou chronique, malgré l'étendue des lésions. Il en est de même en cas de lésions cardiaques accompagnées d'une dégénérescence aiguë du myocarde et suivie d'une mort brutale. Ainsi, le diagnostic qui se base sur l'évolution des teneurs de la SGOT n'est que d'un intérêt limité. Il doit, dans tous les cas, être accompagné d'un diagnostic clinique détaillé et précis.

9.2.1.1.2. - FORME CLINIQUE ASSOCIEE A LA DEGENERESCENCE HEPATIQUE D'ORIGINE ALIMENTAIRE :

Chez le porc, la DMN se produit simultanément lors de la dégénérescence hépatique d'origine alimentaire. Elle est souvent associée à :

- une ulcération de la muqueuse gastrique ;
- un brunissement de la graisse ;
- la sudation ;
- une micro-angiopathie d'origine alimentaire.

D'après OBEL (288), dans 60 % des cas, on observe une dégénérescence cireuse des muscles striés. La dégénérescence hépatique reste cependant l'altération essentielle observée chez le porc, et est absente chez la plupart des ruminants.

La dégénérescence hépatique expérimentale se développe dans les conditions semblables à celles maintenues lors du développement de la nécrose hépatique chez le rat (288). A cause de cette ressemblance, d'une part, et de l'interaction DMN - dégénérescence hépatique chez le porc, d'autre part, il a été difficile de savoir de quelle manière les facteurs étiologiques de ces deux maladies diffèrent. D'après les travaux réalisés par le "National Veterinary Institute" en Suède, il semble que le sélénium soit capable de prévenir la maladie de dégénérescence hépatique chez le porc et que cette prévention est moins efficace dans le cas de la DMN. La dégénérescence hépatique a été ainsi considérée comme une maladie de carence en sélénium beaucoup plus significative que la DMN. Selon ULLREY (423), une teneur de 0,1 ppm en sélénium est nécessaire pour la prévention.

9.2.1.1.2.1. Symptomatologie :

La maladie frappe les porcs âgés de 3 à 15 semaines. Elle sévit d'habitude en automne, mais il n'est pas rare de la rencontrer pendant toute l'année.

A cause de la durée brève de la maladie et de sa forte mortalité, les premiers cas passent inaperçus et non identifiés. Ainsi, elle est souvent considérée comme une maladie subclinique.

Parfois, il est possible de faire certaines observations : les porcs, pendant la période précédant la mort, présentent une dyspnée et des troubles digestifs (vomissements et diarrhées). La température rectale est normale.

Si la mort n'a pas lieu tout de suite, d'autres symptômes peuvent être observés : perte d'appétit et anorexie, ictère.

9.2.1.1.2.2. Evolution :

La maladie évolue généralement vers la mort. Taux de mortalité : 20 % (423).

9.2.1.1.2.3. Lésions :

Elles sont observées surtout au niveau du foie :

- Forme aiguë : le foie est mou, la surface est fibreuse. On observe des régions nécrotiques et hémorragiques. La vésicule biliaire est épaissie et oedémateuse.
- Forme chronique : le foie montre une surface rugueuse sillonnée de cicatrices et une hyperplasie nodulaire. Le lobule dextro-latéral est souvent touché.

9.2.1.1.2.4. Modifications biochimiques :

Parallèlement aux muscles, le tissu hépatique contient une quantité relativement importante de GOT. Le diagnostic de la dégénérescence hépatique ne peut pas reposer sur l'élévation sérique de la GOT car, chez le porc, la dégénérescence est associée, le plus souvent, à la DMN. Pour cela, on fait appel aux enzymes spécifiques du foie. Dans ce but, l'OCT a été utilisée ; cette dernière n'est pas affectée par l'atteinte musculaire.

9.2.1.1.3. - FORMES SUBCLINIQUES DE LA DMN :

9.2.1.1.3.1. "Illthrift" ou "Selenium responsive unthriftiness" (SRU) :

La SRU est une maladie qui frappe le bétail, et en particulier les moutons, en Nouvelle-Zélande (166). Elle est caractérisée principalement par une perte de poids, un amaigrissement, accompagnés de diarrhée abondante. La laine produite est de mauvaise qualité. L'usage prophylactique et thérapeutique du sélénium a donné de bons résultats : OLDFIELD (294) a rapporté que l'administration du sélénium aux moutons atteints de SRU entraîne un gain de poids, mais selon BLAXTER (33), cet effet n'a lieu que lors d'une carence prononcée en sélénium.

9.2.1.1.3.2. Stérilité chez les brebis :

Comme la SRU, la stérilité provoquée par une carence en sélénium est parfois le seul signe de la DMN subclinique. En Nouvelle-Zélande, la forme congénitale de la DMN est fréquente : plusieurs cas de stérilité ont été rapportés, et tous ont été corrigés par l'administration de sélénium.

9.2.1.1.3.3. "Periodontal disease" : Maladie de croissance de la dentition :

Il s'agit, là aussi, d'un syndrome de carence en sélénium, caractérisé par la perte des dents, qui est parfois associée à une infection gingivale et alvéolaire. Ce syndrome est rencontré chez les brebis.

9.2.1.2. Syndromes de carence observés chez la volaille :

Les poussins souffrant d'une carence poussée en sélénium et en vitamine E sont sujets à l'un au moins des trois syndromes suivants :

- encéphalomalacie ;
- diathèse exsudative ;
- et/ou dystrophie musculaire d'origine nutritionnelle.

Si la carence en ces deux éléments est modérée, il y a atteinte des muscles lisses "GIZZARD" et du muscle cardiaque.

9.2.1.2.1. - ENCEPHALOMALACIE :

Lorsque de jeunes poussins sont nourris par rations composées de fortes proportions de saindoux et pauvres en vitamine E, on note une atteinte du système nerveux central à laquelle on donne le nom d'encéphalomalacie d'origine nutritionnelle. Du point de vue clinique, la maladie est caractérisée par de l'ataxie, spasme, raideur de la nuque, et des paralysies. On observe des lésions cérébrales et médullaires localisées le plus souvent au niveau du cervelet. Il y a hémorragie, oedème, dégénérescence des cellules de Purkinje et des plages granulaires.

L'encéphalomalacie semble être la conséquence du phénomène d'auto-oxydation des acides gras insaturés. Elle ne peut être reproduite qu'à la suite de l'administration de certains acides gras insaturés dans la nourriture (acides arachidonique et linoléique, et non l'acide linoléique) en l'absence de vitamine E (86). Certains antioxydants, tels que le bleu de méthylène et l'éthoxyquine, ont un effet préventif.

Selon DAM (87), le sélénium n'a aucun effet protecteur aux doses allant de 0,5 à 10 ppm dans la nourriture. Ces observations sont en contradiction avec celles de CENTURY et HORWITT (62), et JENKINS (195), qui ont affirmé le rôle protecteur du sélénium.

La vitamine E agirait en tant qu'agent antioxydant.

9.2.1.2.2. - DEGENERESCENCE MUSCULAIRE D'ORIGINE NUTRITIONNELLE :

Elle est caractérisée par une dégénérescence étendue des fibres musculaires, en particulier les muscles pectoraux. Il s'agit d'une dégénérescence cireuse de ZENKER associée, histologiquement parlant, à une infiltration périvasculaire avec accumulation d'éosinophiles, de lymphocytes et d'histiocytes.

L'action du sélénium dans la prévention de la DMN chez les poussins a été étudiée par plusieurs équipes (87, 282) qui ont montré que l'addition de sélénite de sodium, à une teneur supérieure à celle requise pour la prévention de la diathèse exsudative, permet de réduire d'une manière significative la fréquence d'apparition de la maladie. Selon ces mêmes auteurs, le sélénium, à lui seul, est incapable de prévenir à 100 % la maladie, quelle que soit la dose administrée.

9.2.1.2.3. - DIATHESE EXSUDATIVE :

En 1938, DAM (84) a décrit un syndrome de carence en vitamine E chez les poussins, caractérisé par une exsudation plasmatique, d'où l'appellation : diathèse exsudative.

L'exsudation s'effectue à partir des capillaires, et l'accumulation du plasma a lieu sous la peau et au niveau des muscles. Dans la première phase de la maladie, le tissu atteint est rouge, relevant d'une hyperémie et d'une hémorragie diffuse (85).

L'exsudat est verdâtre. La couleur est due à la décomposition de dérivés de l'hémoglobine.

Il y a baisse de la teneur en protéines plasmatiques totales. Cette baisse est encore plus accentuée pour l'albumine. Il y a baisse du rapport albumine/globulines (137).

Il n'y a pas atteinte du système de coagulation, le taux de prothrombine est normal.

Etiologie :

SCOTT (367) a démontré que les poussins nourris de protéines provenant de levures du genre *Torula*, et en l'absence de vitamine E, présentaient une diathèse exsudative. Cette dernière pouvait être prévenue par administration d'alpha-tocophérol, et non de gamma-tocophérol, ou d'autres antioxydants. Les acides gras insaturés sont sans aucun effet.

PATTERSON (307), puis SCHWARZ (363), ont rapporté que l'addition de faibles quantités de sélénium à la nourriture, ou bien la présence du facteur 3, permettent de prévenir l'apparition de la maladie. Une teneur de 0,1 ppm en sélénium (sélénite de sodium) est très efficace.

THOMPSON et SCOTT (415) ont déterminé avec précision les besoins nécessaires en sélénium et en vitamine E pour la prévention de la diathèse exsudative. En présence de 100 ppm de vitamine E, la teneur en sélénium doit être $\leq 0,01$ ppm. Cette dernière passe à 0,02 ppm lorsque la teneur en vitamine E tombe à 10 ppm. En l'absence de vitamine E, une teneur de 0,05 ppm est suffisante.

9.2.1.2.4. - ATTEINTE DES MUSCLES LISSES (GIZZARD)
ET "MYOPATHIE CARDIAQUE DES POUSSINS" :

Le sélénium, à lui seul, est incapable de prévenir ces deux maladies (366).

9.2.1.3. Autres syndromes de carence :

9.2.1.3.1. - NECROSE HEPATIQUE CHEZ LE RAT :

Les rats, soumis à un régime carencé en cystine, présentaient une nécrose hépatique et mouraient un mois après le début de l'expérimentation (365). Pendant toute cette durée, aucun signe clinique n'est évident, le comportement est normal. Mais 1 à 2 jours avant la mort, il y a apparition d'une fatigue générale et amaigrissement. Au niveau du foie, il y a baisse de l'oxydation cellulaire (365).

Etiologie :

La prévention de la nécrose peut se faire par administration de la vitamine E. Ceci a été démontré par SCHWARZ en 1944 (359).

Plus tard, il a été démontré que, à côté de la cystine et de la vitamine E, un troisième facteur intervient d'une manière efficace. A cet élément, SCHWARZ a donné le nom de "Facteur 3" (361, 365).

La structure n'a pas été élucidée, mais selon SCHWARZ, il s'agit d'un dérivé sélénié non aromatique, de faible poids moléculaire.

Il semble, à l'heure actuelle, que le facteur 3 soit représenté par la glutathion peroxydase.

Le sélénite joue le même rôle que le facteur 3, mais l'activité est réduite de moitié.

9.2.1.3.2. - RESORPTION FOETALE :

Il s'agit du premier symptôme observé lors d'une carence en vitamine E chez les rats femelles, durant la période de gestation. Cette résorption est due à une dégénérescence de l'utérus, qui est réversible et peut être corrigée par administration de la vitamine E. Les antioxydants ne protègent pas contre la résorption foetale, mais cependant ils sont capables d'améliorer la capacité de reproduction par leur effet antioxydant vis-à-vis de teneurs suboptimales en vitamine E dans la nourriture.

HARRIS (165) a démontré que les dérivés séléniés n'ont aucun effet protecteur. Les dérivés testés étaient la sélénocystine, le sélénite de sodium et l'acide sélénieux. Ceci a été confirmé plus tard par CHRISTENSEN, en 1958 (70).

9.2.1.3.3. - BRUNISSEMENT DES GRAISSES :

On observe le phénomène de brunissement des graisses chez les animaux carencés en vitamine E et nourris par rations enrichies en AGI tels que l'huile de foie de morue. La coloration brune du tissu adipeux est due à la présence de deux pigments : l'un liposoluble, l'autre hydrosoluble et appelé céroïde. Ces deux pigments montrent en U.V. une fluorescence jaune verdâtre.

La peroxydation lipidique a lieu chez les animaux dans les mêmes conditions opératoires citées ci-dessus.

La vitamine E et les antioxydants sont capables de prévenir la peroxydation des lipides et la formation de céroïde, alors que le sélénium, administré à une teneur de 1 ppm sous forme de dioxyde de sélénium, est sans aucun effet (70).

9.2.1.3.4. - BRUNISSEMENT DE L'UTERUS :

Le brunissement de l'utérus a lieu chez les rats femelles carencés en vitamine E. Ce syndrome ne dépend guère de la présence d'AGI dans la nourriture. La coloration brune serait due à une oxydation anormale des dérivés protéiques, et probablement à une copolymérisation des dérivés protéiques avec les produits d'auto-oxydation des acides gras poly-insaturés.

Le sélénium n'a aucun effet protecteur (70).

9.2.1.3.5. - DEPIGMENTATION DES DENTS :

La disparition de la coloration orange des incisives des rats s'observe d'une manière évidente dans les lots carencés en vitamine E. Cette dépigmentation dépend de la teneur alimentaire en AGI (140). Une nourriture enrichie en huile de foie de morue ou en saindoux entraîne rapidement la dépigmentation (139).

La coloration de l'émail est due principalement à la présence d'ions ferriques. Lors d'une dépigmentation, il y a baisse de la teneur en fer dans l'émail.

Les études concernant l'effet du sélénium sur la dépigmentation ont abouti à des résultats contradictoires. ATERMAN (20) a énoncé que le parallélisme existant entre le sélénium et la vitamine E dans la prévention de la nécrose hépatique du rat n'est pas observé dans la dépigmentation dentaire. CHRISTENSEN (70) a approuvé ces résultats et a démontré l'inefficacité d'une teneur de 1 ppm en sélénium.

Cependant, IRVING (192) a abouti à des résultats complètement différents. Selon cet auteur, le sélénium, à une teneur de 0,9 ppm, est capable de remédier à une carence en vitamine E. A cette teneur, la dépigmentation disparaît chez 90 % des rats, 90 jours après le début du traitement. Une teneur de 0,3 ppm semble être inefficace, on n'observe qu'une amélioration provisoire.

SEWARD (370) a observé qu'une teneur de 0,1 ppm en sélénium est sans effet chez les rats nourris par rations de faible teneur en protéines et contenant 1 % d'huile de foie de morue. Mais cependant, en l'absence d'huile de foie de morue, cette teneur est largement suffisante pour prévenir toute dépigmentation dentaire.

Il semble évident que, du choix de la nourriture et de la technique utilisée, dépendent les résultats observés et la réponse du sélénium.

9.2.1.3.6. - AUTOLYSE RENALE :

Chez les rats carencés en vitamine E et nourris par rations fortement enrichies en AGI (108, 268), on observe une dégénérescence du tube contourné et une tendance à l'autolyse post-mortem.

Les antioxydants tels que la vitamine E, le bleu de méthylène, mais non le sélénite, ont un effet préventif sur l'apparition des lésions.

9.2.1.3.7. - INTOXICATION PAR LE TETRACHLORURE DE CARBONE :

Lorsque de la vitamine E est administrée aux souris nourries par rations de faible teneur en protéines, elle présente un effet protecteur vis-à-vis d'une dose létale de tétrachlorure de carbone : 2 ml/kg par voie intra-péritonéale (370). La toxicité du tétrachlorure de carbone chez les rats carencés en vitamine E serait due à son action hépatotrope. L'administration de tétrachlorure de carbone accélère en effet le phénomène de peroxydation lipidique au niveau du foie.

SEWARD (370) a démontré l'effet protecteur du sélénium à 0,1 ppm vis-à-vis d'une dose létale de tétrachlorure de carbone chez les rats carencés en vitamine E.

FODOR et KEMENY (119) ont, eux aussi, observé le même effet chez les rats en cela, en se basant sur des critères histopathologiques.

9.2.1.3.8. - STOCKAGE HEPATIQUE DE LA VITAMINE A :

L'auto-oxydation des acides gras poly-insaturés qui a lieu chez les espèces carencées en vitamine E entraîne la destruction de certains constituants et métabolites essentiels tels que la vitamine A.

Lorsque la vitamine A est administrée associée à l'huile de foie de morue, et en l'absence de vitamine E, le stockage hépatique est beaucoup moins important qu'en présence de teneurs adéquates en vitamine E.

Ceci est dû, évidemment, à l'effet antioxydant de la vitamine E, puisque d'autres antioxydants tels que le bleu de méthylène et la thiodiphényl amine entraînent un effet comparable.

9.2.1.3.9. - HEMOLYSE :

Les relations existant entre l'hémolyse et une carence en sélénium et en vitamine E seront examinées en détail lors de l'étude du rôle du sélénium en tant que constituant essentiel de la glutathion peroxydase.

9.2.2. - Chez l'homme :

9.2.2.1. Effet sur la croissance :

Les premiers travaux datent de 1961, lorsque John WATERLOW et Robert MONTGOMERY (433) ont décidé d'étudier l'effet du sélénium sur la croissance des enfants atteints de kwashiorkor. Un gain de poids a été observé immédiatement après le début du traitement.

La même observation a été réalisée chez les enfants atteints d'une dénutrition et provenant des camps de réfugiés en Jordanie (257). Un mois après le début d'hospitalisation, ils ont reçu par voie orale 30 µg de sélénium par jour, sous forme de sélénite de sodium dissous dans quelques millilitres de lait. Quelques jours après, le rythme de la croissance observé était beaucoup plus rapide que celui du premier mois.

9.2.2.2. Effet sur l'anémie associée au kwashiorkor :

Associée au kwashiorkor, on observe souvent une anémie qui, dans la majeure partie des cas, répond à l'administration d'acide folique, de vitamine B₁₂, de vitamine C et de fer.

La vitamine E joue un rôle bénéfique. L'administration de 280 mg d'alpha-tocophérol par voie orale et de 100 mg de phosphate d'alpha-tocophérol par voie intra-musculaire engendre une réponse réticulocytaire, suivie d'une augmentation du taux d'hémoglobine et de l'hématocrite, du taux de la vitamine C et du folate sérique (256). Dans 3 cas sur les 5 atteints de dénutrition parmi les enfants des camps de réfugiés en Jordanie qui ont reçu 30 µg de sélénium par jour, la même réponse que celle observée à la suite de l'administration de vitamine E a été signalée.

Aucune variation des teneurs sériques en LDH, SGOT et SGPT, n'a été observée.

BURK (47), en 1967, a retrouvé chez les enfants sous-alimentés, au Guatemala, une teneur sanguine en sélénium inférieure à celle observée chez les enfants normaux. Il en est de même pour LEVINE et OLSON (236) qui ont déterminé les teneurs sanguines en sélénium des enfants sous-alimentés en Thaïlande.

Aucune explication n'a été fournie, mais il semble que la faible teneur sanguine en cet élément est liée principalement à la baisse de la teneur du sang en protéines. Les protéines jouent un rôle fondamental dans le transport et la fixation du sélénium, toute altération de la teneur sanguine en protéines a un retentissement sur le métabolisme du sélénium.

9.2.2.3. "Sudden infant death" (SID) :

Mort soudaine chez le nourrisson :

La mort soudaine observée chez les porcs nourris par rations carencées en sélénium et non supplémentées en vitamine E a fait penser au syndrome SID rencontré chez les nourrissons. Selon MONEY (266), chez les nouveau-nés, les teneurs en vitamine E sont inférieures à celles des adultes. Selon le même auteur, ces teneurs restent inférieures à la normale chez les enfants nourris au lait de vache en Nouvelle-Zélande. Ceci est accompagné d'une élévation de la fréquence d'apparition du SID. L'explication suivante a été donnée : la plupart des laits de vache, en Nouvelle-Zélande, n'apportent pas du sélénium en quantité suffisante pour remédier à une carence en vitamine E. Il en résulte une peroxydation des phospholipides et des lipoprotéines des parois capillaires pulmonaires.

D'après SHAMBERGER (371), le pourcentage de mort néo-natale aux Etats-Unis, et qui est de 1 % en moyenne, varie d'une manière inversement proportionnelle à la teneur en sélénium dans le fourrage.

RHEAD (328), en 1972, n'a observé cependant aucune différence entre les teneurs sanguines en sélénium chez les enfants normaux et celles déterminées chez les enfants décédés de mort soudaine, mais n'a pas exclu la possibilité d'interaction vitamine E - sélénium. Les teneurs en vitamine E étaient identiques chez les deux. Il a expliqué ceci par le fait que les modifications histologiques et physiologiques provoquées par une carence en vitamine E, quelques jours après la naissance, peuvent être irréversibles et persister après le rétablissement des teneurs normales.

D'après RHEAD (328), chez les enfants nourris au lait maternel riche en vitamine E, les teneurs sanguines en vitamine E rejoignent la valeur normale des adultes en 8 jours, alors que chez ceux qui sont nourris au biberon, la période nécessaire pour cela s'étale de 6 à 8 mois.

En 1973, à la suite de la multiplication des observations et des déterminations des teneurs sanguines en vitamine E chez les nourrissons décédés de mort soudaine et les autres, RHEAD (327) a rejeté définitivement l'hypothèse de MONEY et n'a pas hésité à rappeler la relation étroite existant entre le taux de mortalité chez les nourrissons et l'habitude de fumer au cours de la période de grossesse.

9.3. MECANISMES D'ACTION -

9.3.1. - Le sélénium, agent antioxydant dans le phénomène de peroxydation :

9.3.1.1. Rappels sur le phénomène de peroxydation lipidique :

Lors d'une carence en vitamine E, le phénomène de peroxydation lipidique a lieu aussi bien in vitro qu'en vivo (412). Ces réactions sont capables d'entraîner des dégâts importants au niveau des cellules, des particules subcellulaires, des protéines, enzymes et acides aminés.

On a observé ainsi :

- certaines altérations du métabolisme cellulaire, entraînant une baisse de la durée de vie des globules rouges et une dégénérescence des microsomes et des mitochondries (283) ;
- des phénomènes de polymérisation, aboutissant à la formation de dérivés inactifs qui peuvent être des polymères solubles ou insolubles. En effet, les radicaux libres intermédiaires provenant des AGI lors de la peroxydation réagissent avec les protéines et les enzymes, et modifient leurs propriétés (345, 346) ;
- destruction des acides aminés. Ceci a été démontré au niveau de la gamma-globuline, de la catalase, de l'albumine sérique, de l'hémoglobine et de l'ovalbumine. Parmi les acides aminés les plus sensibles, citons la méthionine, l'histidine, la cystine et la lysine.

9.3.1.2. Mécanisme d'action proprement dit :

Le sélénium et les dérivés organo-séléniés ont des propriétés antioxydantes. Le mécanisme d'action a été longuement discuté, et plusieurs hypothèses ont été proposées :

- il s'agit d'un inhibiteur de la peroxydation à la suite d'une compétition entre les dérivés organo-séléniés et

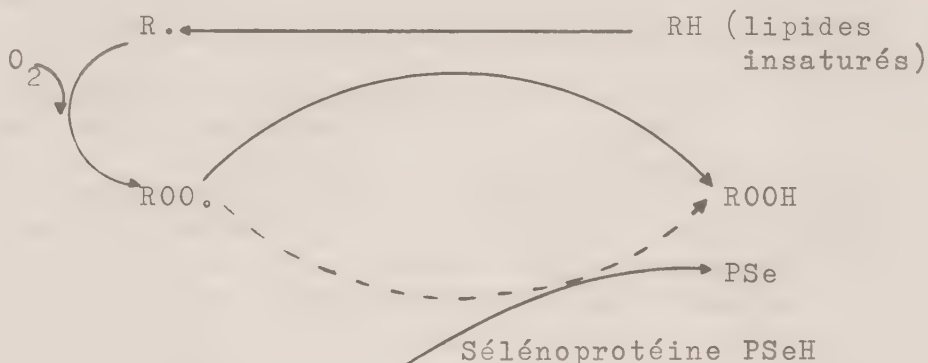
les substrats pour le radical libre initiateur de la réaction autocatalytique ;

- il permet de décomposer les peroxydes formés en dérivés inactifs puisqu'il ne s'agit plus de radicaux libres ;
- il permet la soustraction des radicaux libres au milieu ;
- il catalyse les réactions d'oxydo-réduction permettant de maintenir les dérivés soufrés dans la forme biochimiquement active.

9.3.1.2.1. - INHIBITION DE LA PEROXYDATION :

Les composés agissant de cette manière baissent d'une manière sensible le taux de production de radicaux libres (158). Il s'agit habituellement de composés phénoliques, d'amines et de dérivés soufrés. La vitamine E est l'exemple typique d'un inhibiteur de structure phénolique.

En l'absence d'une concentration adéquate en antioxydant, les lipides insaturés, ainsi que les peroxydes correspondants, se décomposent spontanément ou à la suite d'une attaque par l'oxygène moléculaire pour donner naissance à des radicaux libres.



Le radical libre qui en résulte va initier une réaction en chaîne autocatalytique qui peut s'arrêter soit à la suite de la consommation totale du lipide en question, soit à la suite de réactions secondaires.

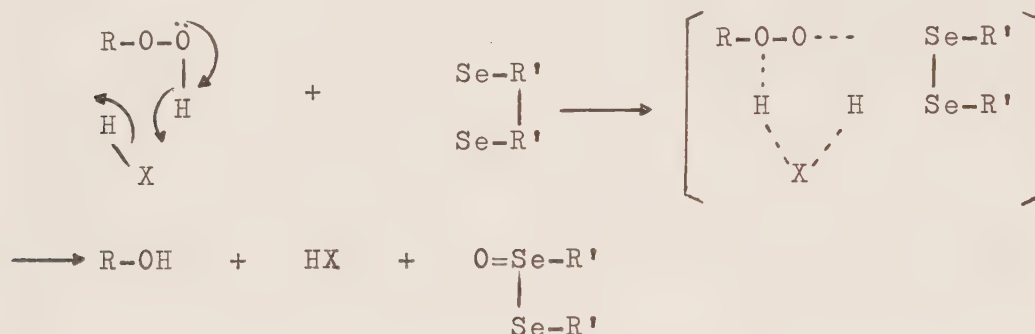
Les antioxydants, inhibiteurs de la peroxydation, agissent en compétition avec le substrat pour le radical libre formé à la suite de l'attaque initiale.

Une étude comparative a été réalisée sur les protéines provenant d'animaux divers nourris par rations supplémentées en sélénium et sur les protéines provenant de différents lots témoins. Les protéines étaient d'origine hépatique et rénale. Les sélénoprotéines étaient capables d'inhiber l'oxydation de l'acide linoléique en solution in vitro ; l'activité était de 20 à 500 % plus élevée que celle des protéines provenant des lots témoins. L'activité d'une mole de sélénoprotéine était 50 à 500 fois plus importante que celle d'une mole de vitamine E. Cette activité était conservée même à la suite de l'addition d'agents peroxydants.

9.3.1.2.2. - DECOMPOSITION DES PEROXYDES :

Ces agents donnent naissance à des dérivés stables qui ne sont pas des radicaux libres.

Il s'agit d'une réaction de substitution nucléophile de type SN_2 sur l'oxygène :

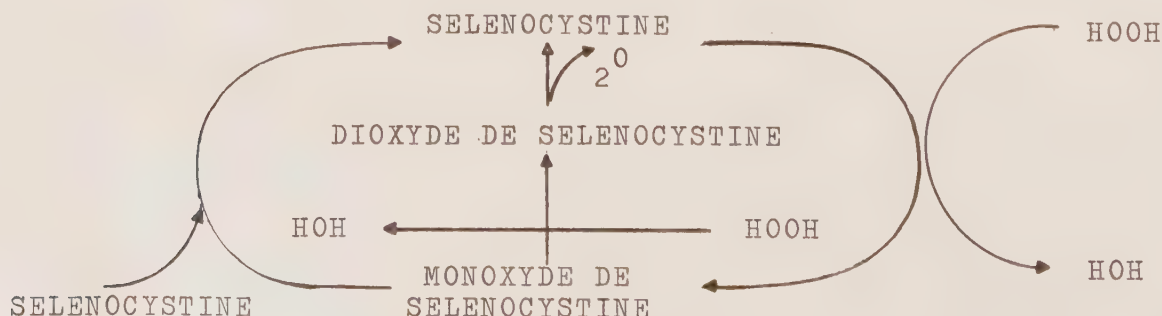


La présence de groupement attracteur d' e^- dans le peroxyde et de groupement donneur d' e^- dans l'agent de décomposition augmente le taux de décomposition du peroxyde. Le caractère nucléophile du sélénium est plus accentué que celui du soufre. Ainsi, dans les mêmes conditions expérimentales, on doit s'attendre à des réactions plus rapides avec les dérivés sélénisés qu'avec les dérivés soufrés.

9.3.1.2.2.1. Action de la sélénocystine :

L'étude a été réalisée sur la méthionine, la cystine et leurs analogues sélénisés (56). On constate que la méthionine réagit avec la plus grande vitesse avec l'eau oxygénée, mais la sélénocystine entraîne la décomposition la plus poussée. Alors qu'une mole de méthionine ne consomme qu'une seule mole d'eau oxygénée, une mole de sélénocystine, par contre, peut consommer 3 moles d'eau oxygénée.

L'analyse par chromatographie montre que les dérivés d'oxydation de la cystine et de la sélénocystine conservent la même activité ; l'activité de la sélénocystine serait due, en majeure partie, à son passage à l'état de dioxyde. A côté de ceci, il ne faut pas écarter la possibilité de régénération de la sélénocystine à partir du dioxyde correspondant. Plusieurs mécanismes ont été proposés, et ils sont représentés par le schéma suivant :



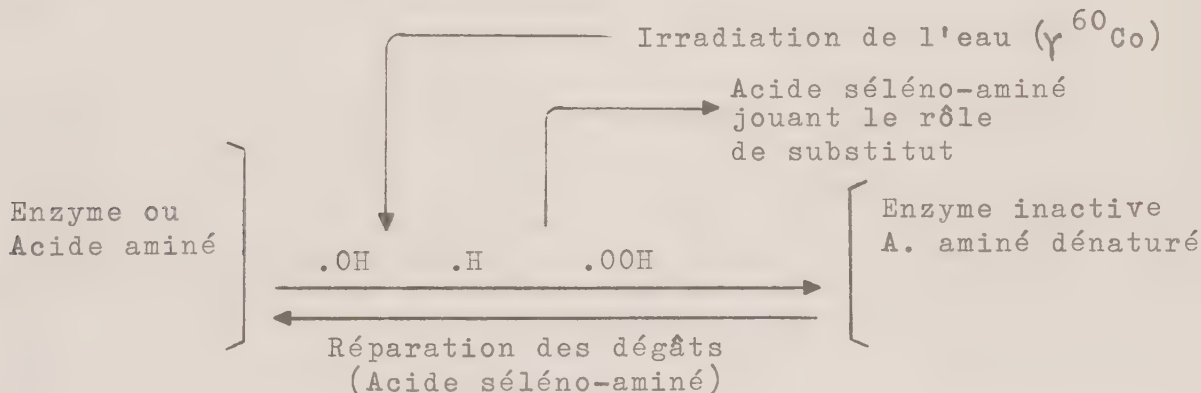
9.3.1.2.2.2. Synergie d'action entre les inhibiteurs de la peroxydation et les agents de décomposition :

Il existe une synergie d'action entre les inhibiteurs de la peroxydation et les agents de décomposition des peroxydes. Les inhibiteurs diminuent le taux de formation de radicaux libres responsables de l'auto-oxydation. Si certains peroxydes se forment malgré la présence d'inhibiteurs, l'agent de décomposition permet de les éliminer. Une synergie d'action existe ainsi entre la sélénocystine et l'alpha-tocophérol.

9.3.1.2.3. - SOUSTRACTION DES RADICAUX LIBRES AU MILIEU (383) :

Les propriétés antioxydantes qui ont déjà été énumérées sont observées à l'état normal dans les systèmes producteurs de radicaux libres, c'est-à-dire en présence d'acides gras ou de lipides insaturés subissant le phénomène de peroxydation. Cependant, d'autres mécanismes de type radicalaire interviennent au cours d'une irradiation ionisante, et cela en l'absence d'acides gras insaturés et de leurs peroxydes correspondants.

La sélénométhionine et son analogue soufré ont été testés en vue d'étudier leur effet protecteur sur les enzymes et les acides aminés en solution, leur rôle de substitut et leur rôle de réparateur des dégâts causés par une radiation gamma-ionisante du cobalt 60



Les tests ont été réalisés sur des enzymes et des acides aminés en solution dans l'eau, auxquels ont été ajoutés de la méthionine, de la cystine, et leurs analogues séléniés. L'élimination d'un dérivé est définie comme étant la quantité d'irradiation nécessaire pour que sa concentration initiale soit réduite de moitié ($D \frac{1}{2}$).

La méthionine a un effet protecteur important sur les acides aminés relativement radiostables comme l'alanine et la leucine, mais la sélénométhionine a un effet protecteur, aussi bien sur les acides aminés labiles que sur les acides aminés stables.

D'autre part, les $D \frac{1}{2}$ de solutions à 0,01 M et 0,02 M de sélénométhionine sont, respectivement, de $3,6 \cdot 10^6$ et $5,6 \cdot 10^6$ rads, alors que les $D \frac{1}{2}$ correspondant aux solutions de méthionine de mêmes concentrations sont de $1,4 \cdot 10^6$ et $3,6 \cdot 10^6$, respectivement. On remarque ainsi que la sélénométhionine n'a pas uniquement un effet protecteur, mais elle est aussi plus difficilement détruite par l'irradiation ionisante que la méthionine.

Pour mieux évaluer les dégâts provoqués sur les protéines, les auteurs ont choisi comme critère la perte de l'activité enzymatique. Ainsi, l'effet protecteur de la sélénométhionine est de 5,2 et 2,3 fois celui de la méthionine, et l'effet protecteur de la sélénocystine est de 3,9 et 1,9 fois celui de la cystine, sur l'alcool déshydrogénase et la ribonucléase, respectivement.

Mécanisme :

Rôle de "scavenger" ou de substitut :

Il s'agit d'un phénomène de compétition entre les dérivés sélénés et les acides aminés pour les radicaux libres provenant de l'ionisation de l'eau sous l'effet de l'irradiation ionisante.

Effet réparateur :

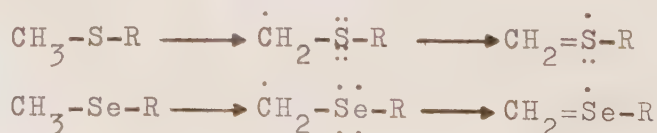
La réparation des dégâts s'effectue de la manière suivante : le réparateur peut céder un électron ou un atome d'hydrogène sans se dissocier. La supériorité et la performance des dérivés sélénés sont attribuées à leur faible potentiel d'ionisation, leur énergie de liaison et leur caractère métallique.

Ainsi, lors de l'irradiation, un acide aminé ou une protéine se transforme en un radical libre à la suite de la perte d'un électron ou d'un atome d'hydrogène. La réparation du radical ainsi formé consiste en la soustraction d'un électron ou d'un atome d'hydrogène au dérivé qui joue le rôle de protecteur et qui est ici représenté soit par la méthionine, soit par son analogue sélénié, aboutissant ainsi à l'ionisation de ces derniers.



La réaction (2) se fait plus rapidement que la première à cause de la différence d'énergie d'ionisation entre un électron 4 p du sélénium et 3 p du soufre.

La stabilité des radicaux formés est due à une mésomérie de résonance :

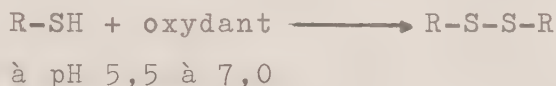


L'électron célibataire du sélénium est plus stable que celui du soufre à cause de l'orbitale 4 f. Ceci permet d'expliquer la valeur $D \frac{1}{2}$ plus élevée pour la sélénométhionine.

9.3.2. - Catalyse des réactions d'oxydo-réduction :

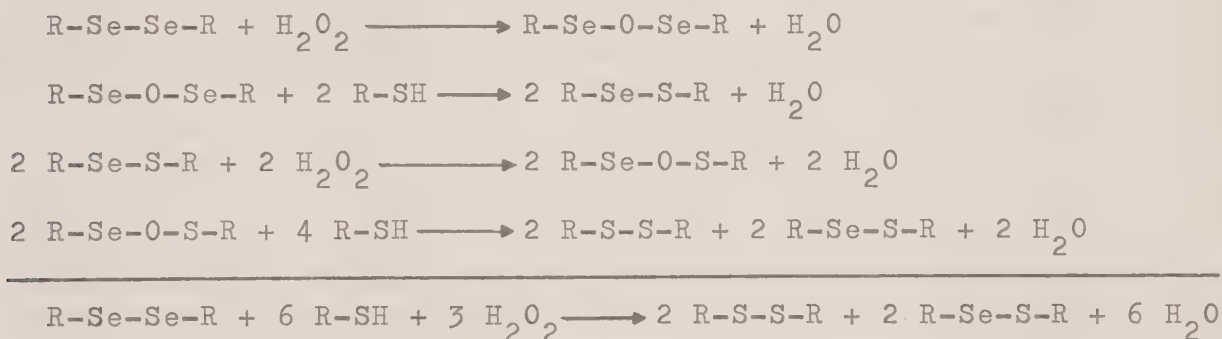
Les milieux biologiques contiennent des dérivés soufrés qui doivent être maintenus dans un état d'oxydation déterminé en vue de conserver leur activité.

Dans le but d'étudier le rôle joué par les dérivés sélénisés dans les phénomènes d'oxydo-réduction et les relations existant avec les acides aminés soufrés, CALDWELL et TAPPEL (57) ont testé l'action de la cystine et de la sélénocystine, respectivement, sur la réaction suivante :

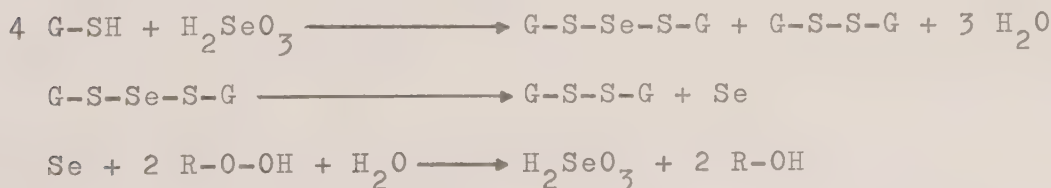


où R-SH représente la cystéine, le glutathion et l'homocystéine et où l'oxydant est de l'hydroperoxyde d'hydrogène, de tert-butyl et de cumène.

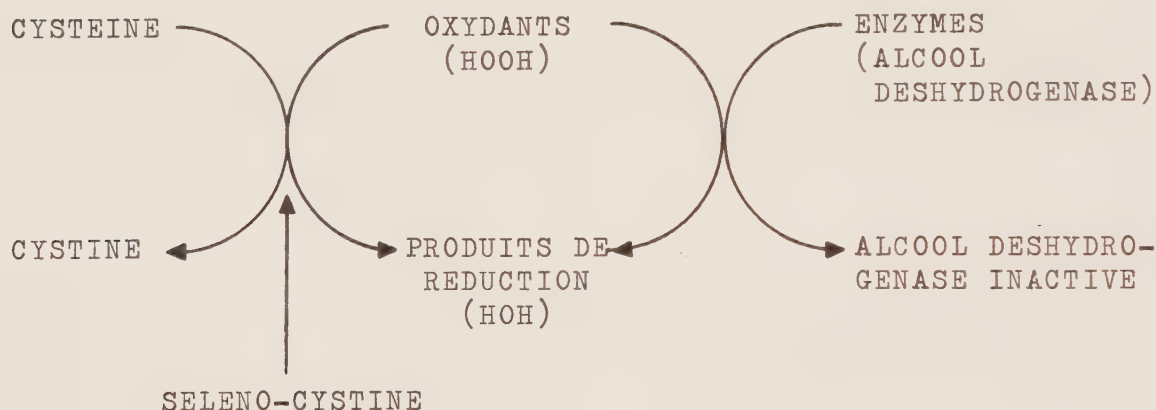
Alors que la cystine ne modifie pas la cinétique de la réaction, la sélénocystine, par contre, permet de déplacer l'équilibre à droite. Cependant, elle est partiellement consommée au cours de l'oxydation :



Le sélénium inorganique (sélénite) et la sélénocystéine ont la même propriété que la sélénocystine. Le mécanisme proposé pour le sélénite est le suivant :



Ces expériences ont été refaites en présence d'enzymes à groupements thiols et dont l'activité est liée à la présence de groupements SH libres. Il s'agit de l'alcool déshydrogénase et de la créatinine kinase. En présence de sélénocystine, l'activité enzymatique était, respectivement, 2 à 3 fois et 5 à 15 fois supérieure à celle observée à la suite d'addition de cystine. Ainsi, la sélénocystine joue un rôle important dans le maintien de l'activité de certaines enzymes. Le mécanisme proposé est le suivant :



Le sélénite, la sélénocystéine et la sélénocystine, ont une activité glutathion peroxydase. Par contre, le séléniate et la sélénométhionine sont inactifs (30). Cette activité a été déterminée en présence de glutathion et par comparaison avec la glutathion peroxydase contenue dans un hémolysat d'origine humaine. La constante K_M de MICHAELIS-MENTON a été déterminée :

	SELENITE	SELENO D.L. CYSTEINE	HEMOLYSAT (GSH Px)
	M	M	M
KM GSH	$9,9 \cdot 10^{-4}$	$3,6 \cdot 10^{-4}$	$1,02 \cdot 10^{-3}$

L'activité de la glutathion peroxydase est 5.000 fois supérieure à celle des sélénites et de la sélénocystéine si on interprète les résultats en fonction de la teneur en sélénium.

Comme la glutathion peroxydase renferme du sélénium comme nous allons le voir, l'incorporation de l'élément dans une protéine permet d'augmenter son activité catalytique. Il s'agit d'une règle générale observée avec tous les métaux.

9.3.3. - Le sélénium constituant de certaines protéines de structure et de protéines enzymatiques :

Le fait que le sélénium entre dans la constitution de certains enzymes, protéines musculaires (122), ARN et ADN (122), et ARN de transfert (séléno-uridine) (122), prouve l'effet catalytique et le rôle d'oligo-élément nécessaires au métabolisme cellulaire.

Le tiers du sélénium total de l'organisme se trouve localisé au niveau des muscles. Ainsi, Mc CONNELL (244) a déterminé la teneur en sélénium de quelques protéines. Les valeurs trouvées sont les suivantes :

25,9 µg de sélénium/g de myosine,
12,6 µg de sélénium/g d'aldolase,
0,8 µg de sélénium/g de cytochrome,
0,49 µg de sélénium/g d'hémoglobine.

La teneur élevée en sélénium de la myosine, protéine responsable de la contraction musculaire, fait penser que le sélénium peut jouer un rôle dans la libération d'énergie à partir de liaisons chimiques hautement énergétiques. Le myocarde semble renfermer plus de sélénium que les autres muscles. Bien que le rôle du sélénium au niveau du coeur reste à déterminer, son intervention dans le processus d'utilisation de l'oxygène est évidente.

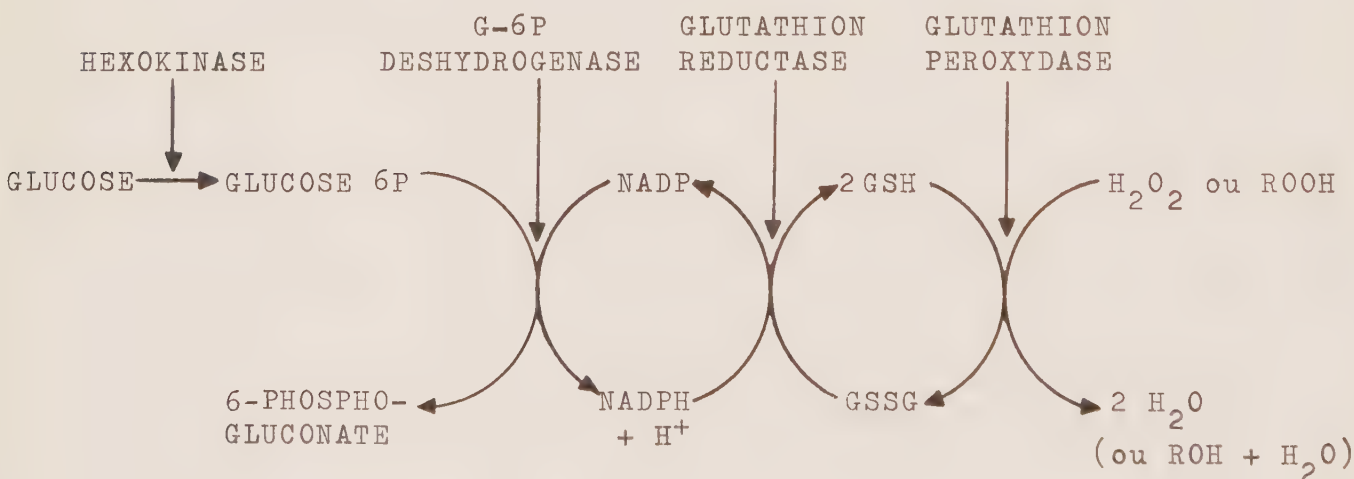
Récemment, une sélénoprotéine de poids moléculaire faible a été isolée à partir du coeur et des muscles semi-tendineux des agneaux nourris par rations enrichies en sélénium (401). Cette sélénoprotéine peut être absente ou se retrouver à l'état de traces chez les animaux nourris par rations pauvres en sélénium ou souffrant de la maladie de dégénérescence musculaire d'origine nutritionnelle.

Dans le but d'isoler cette protéine, les animaux ont reçu une injection de sélénite radioactif. 16 heures plus tard, le coeur et les muscles semi-tendineux ont été prélevés, broyés et homogénéisés. La séparation par chromatographie sur colonne a permis d'isoler une sélénoprotéine de poids moléculaire 10.000 à l'état pur. Cette protéine a été appelée : "selenium binding protein". Le sélénium s'y trouve sous forme de composé organo-sélénié attaché à la protéine par une liaison covalente. Cette protéine est constituée principalement d'acides aspartique, glutamique, de lysine, glycine et leucine. On a rapporté la présence de méthionine en faible proportion et de cystéine et cystine à l'état de traces.

Cette protéine contient un groupement hémique identique au groupement chromophore de la cytochrome C. Bien que les fonctions biologiques de cette protéine restent inconnues, il est très probable qu'elle intervienne dans les phénomènes d'oxydo-réduction.

9.3.3.1. Le sélénium constituant de la glutathion-peroxydase (GSHPx) :

L'effet antioxydant, aussi bien de la vitamine E que du sélénium, joue un rôle important dans la prévention de l'altération de la membrane cellulaire (411). Cependant, alors que la tendance des globules rouges à l'hémolyse in vitro dépend étroitement de la vitamine E, l'action du sélénium était largement discutée (396) et, pour un grand nombre d'auteurs, le phénomène d'hémolyse était complètement indépendant de la présence du sélénium dans le milieu. Ceci laissait entendre qu'il s'agit d'un mécanisme ou d'un site d'action différent pour les deux éléments en question. Or, il s'est avéré que, dans la majorité des cas, les milieux dans lesquels l'hémolyse a été réalisée in vitro étaient exempts de glucose, molécule dont la présence est nécessaire pour le métabolisme érythrocytaire. L'absence du glucose a été considérée par HOEKSTRA comme étant d'une grande importance, vu la relation étroite entre ce substrat et les hémolyses d'origine médicamenteuse (182). En effet, à un métabolisme défectueux (absence de glucose), correspond une baisse de la régénération du glutathion sous sa forme réduite. Cette dernière joue un rôle fondamental dans la conservation de l'intégrité de la membrane cellulaire, intégrité qui est touchée par un certain nombre de médicaments : primaquine, sulfanilamide ... Le glutathion (GSH) semble protéger la cellule par son effet antioxydant : décomposition de peroxydes, et probablement par la protection des groupements sulfhydryls des protéines par certaines réactions d'oxydo-réduction.



HOEKSTRA (182) a émis alors l'hypothèse que le sélénium intervient activement au niveau de cette chaîne de réactions.

Cette hypothèse a permis de lier le rôle joué par le sélénium à la décomposition de l'eau oxygénée et des hydroperoxydes correspondants aux AGI (344) et aux phénomènes d'échange $S-S \rightleftharpoons SH$ (344).

Les résultats ultérieurs (343, 344) ont confirmé cette hypothèse : le sélénium avait un effet protecteur vis-à-vis de l'hémolyse, uniquement à la suite de l'addition du glucose au milieu d'incubation.

Alors que la vitamine E permettait de protéger les érythrocytes (en l'absence ou non du glucose), elle était sans aucune action sur l'hémoglobine dont elle était incapable d'éviter l'oxydation en méthémoglobine, choléglobine et corpuscule de Heinz. Par contre, l'effet antioxydant du sélénium se manifestait aussi bien sur la membrane cellulaire que sur l'hémoglobine.

9.3.3.1.1. - LOCALISATION DU SITE D'ACTION :

Plusieurs observations ont été réalisées : une carence en sélénium entraîne une augmentation de la concentration en GSH dans les globules rouges *in vivo* (343). Le sélénium semble ainsi jouer un rôle au niveau de la consommation de GSH. Ceci a été testé sur un hémolysat de globules rouges (344) en évaluant l'effet du sélénium d'origine alimentaire sur l'aptitude de GSH introduit de réaliser une protection de l'hémoglobine de l'oxydation en présence d'eau oxygénée. Ce n'est que dans les hémolysats provenant de rats ayant reçu du sélénium que le GSH permettait d'éviter l'oxydation de l'hémoglobine (344). D'autres expériences ont montré qu'en présence d'eau oxygénée le GSH disparaît plus rapidement dans les hémolysats provenant de rats nourris par rations renfermant du sélénium que dans les hémolysats provenant de rats souffrant d'une carence en cet élément (344). Ceci montre que la réaction de décomposition de l'eau oxygénée par le GSH dépend étroitement de la présence de sélénium.

Ces résultats nous amènent à penser que l'activité de la glutathion peroxydase (GSHPx) érythrocytaire dépend du sélénium. Ceci, cependant, n'est pas évident puisque GANTHER (128) a isolé un dérivé GS-SeH, beaucoup plus réducteur que le GSH, pouvant être régénéré dans le milieu et agissant ainsi comme catalyseur. Cependant, cette activité catalytique n'a pas pu être restaurée dans les hémolysats provenant de sujets soumis à un régime alimentaire pauvre en sélénium, à la suite de l'incubation avec du sélénite ; d'autre part, cette activité était thermolabile.

Dans ce but, des recherches ont été réalisées en vue de déterminer si le sélénium faisait partie intégrante de la GSHPx. On a injecté du Se^{75} à des rats ; 2 à 4 semaines plus tard, le sang a été prélevé, à partir duquel la GSHPx a été isolée et purifiée. La majeure partie de la radioactivité érythrocytaire accompagnait la GSHPx au cours de la purification (344).

9.3.3.1.2. - LE SELENIUM CONSTITUANT DE LA GSHPx D'ORIGINE BOVINE :

Le poids moléculaire de la GSHPx érythrocytaire des bovins est de 85.000, alors que celui de l'homme est de 100.000 environ. FLOHE (118) a démontré que la GSHPx des bovins est constituée de 4 unités, de poids moléculaire 21.000 chacune. Récemment, il a été démontré (118, 182) que cette GSHPx contient 4 atomes-grammes de sélénium / mole. Il semble qu'il existe un sélénium par unité, ceci n'a pas encore été prouvé.

La nature du sélénium dans la GSHPx est à déterminer. Selon HOEKSTRA (182), le sélénium n'existe ni sous la forme de sélénite, ni sous la forme de séléniate, mais probablement sous forme d'un acide aminé : sélénométhionine ou sélénocystine.

A l'heure actuelle, il est certain que le sélénium est un constituant normal de la GSHPx érythrocytaire des rats (344, 395), moutons (290), bovins (118), et de l'homme (21).

9.3.3.2. La GSHPx en tant qu'élément de diagnostic dans les syndromes de carence en sélénium :

A l'heure actuelle, il est impossible de répondre à cette question. Les observations sont contradictoires.

- 1) Il existe une corrélation étroite entre la teneur en GSHPx du foie et l'absorption de cet élément, d'une part (395), et l'effet protecteur du sélénium de la nécrose hépatique du rat, d'autre part. Il reste à démontrer l'effet protecteur de la GSHPx.
- 2) Plusieurs auteurs (286, 368, 404) ont démontré l'existence d'une relation étroite entre une faible teneur en GSHPx plasmatique et la diathèse exsudative des poussins.

9.3.4. - Le sélénium et les coenzymes Q :

La nécessité de la présence du sélénium pour la biosynthèse de l'ubiquinone a été largement discutée et a été revue en dernier par FROST et LISH (122).

En 1958 et en 1959, MORTON et MOORE (267, 270) ont démontré successivement qu'une carence d'origine alimentaire en vitamine E n'altère pas les teneurs tissulaires en ubiquinone des rats et des cobayes. Plus tard, en 1961, DIPLOCK (95) a réussi à mettre en évidence que "la biosynthèse de l'ubiquinone, contrairement à ce qui a été déjà démontré, dépend d'une manière significative de la vitamine E". La même année, GREEN et DIPLOCK (143) ont découvert la nécessité du

sélénium pour la biosynthèse de l'ubiquinone. Cette découverte a été confirmée, à plusieurs reprises, chez différentes espèces (122). Par contre, les besoins en vitamine E ont été discutés (223).

L'intervention du sélénium dans la biosynthèse du Q₁₀ au niveau du coeur, chez les veaux atteints de dystrophie musculaire d'origine nutritionnelle, a été rendue très probable par HIDIROGLOU (178).

Il est important d'éclaircir les relations existant entre le sélénium, la vitamine E et l'ubiquinone. Le Q₁₀ semble jouer un rôle anti-infectieux et anticancérigène, intervenir dans certaines maladies cardiaques et dans certaines hypertensions expérimentales chez les rats et les chiens. Or, la prévention de ces syndromes et leur traitement reposent sur un apport adéquat en sélénium et en vitamine E (187). Ceci prouve la dépendance et la relation étroite existant entre ces trois éléments.

9.3.5. - Rôle immunologique du sélénium :

Il a été démontré en 1972 (122) que l'administration de la vitamine E ou du sélénium stimule la formation d'anticorps par les lapins qui ont reçu une injection de vaccin antityphos. Cet effet a été confirmé par les travaux ultérieurs de SPALLHOLZ (398, 399) qui a mis en évidence la stimulation de la réponse immunitaire primaire chez la souris nourrie par rations enrichies en sélénium. Il a été rapporté qu'à une teneur allant de 1 à 3 ppm, il y a stimulation de la formation d'anticorps par les souris, à la suite de l'injection de globules rouges de mouton. 4 à 7 jours après l'injection, il y a augmentation nette du taux des IgM, puis celui des IgG au quatorzième jour. Lorsque les teneurs en sélénium sont inférieures à 1 ppm ou supérieures à 3 ppm, la réponse est 2 à 3 fois plus faible. L'administration du sélénium doit être effectuée avant la sensibilisation ou dans les 24 heures qui suivent l'injection. Le sélénium est actif sous la forme de séléniure de sodium et de sélénite de sodium; le séléniate et le diphényl-sélénium sont sans aucun effet.

Récemment, un groupe de chercheurs, à l'Université de Colorado, a proposé l'addition du sélénium aux vaccins afin d'en potentialiser l'action.

9.4. MODES D'ADMINISTRATION DU SELENIUM AUX ANIMAUX -

9.4.1. - La méthode la plus simple consiste à enrichir les sols en sélénium, mais de telles additions nécessitent un contrôle analytique régulier (dosage du sélénium dans les sols et dans les plantes). Il y a aussi un risque de pollution des eaux.

9.4.2. - Aux Etats-Unis, le transport de fourrages riches en sélénium provenant de régions sélénifères vers les régions non sélénifères est possible.

9.4.3. - La "Food and Drug Administration" autorise, à l'heure actuelle, l'addition du sélénium à la nourriture des animaux : les teneurs ne doivent pas dépasser 0,1 ppm pour les poussins âgés de moins de 16 mois, et 0,1 ppm pour les porcs. L'usage est prohibé chez les poules.

La "Food and Drug Administration" autorise aussi l'administration d'une émulsion huileuse de sélénite de sodium et de vitamine E par injections sous-cutanée et intramusculaire, et les capsules de vitamines E et de sélénite de sodium, par un vétérinaire.

9.4.4. - L'usage des implants a été rapporté par JOHNSON (198). Ces implants contiennent du fer à l'état finement divisé et 10 % de sélénium métal. Ils sont retenus dans le rumen du mouton et libèrent progressivement du sélénium en quantité suffisante pour prévenir toute maladie de carence.

10. INTERACTIONS

10.1. VITAMINE E, ACIDES AMINES SOUFRES ET SELENIUM -

Certaines interactions sélénium - vitamine E ont été vues en détail dans le chapitre précédent.

Le sélénite a un effet préventif dans :

- la nécrose hépatique (rats) ;
- la diathèse exsudative (poussins) ;
- l'intoxication au tétrachlorure de carbone (rats, souris) ;
- et la dystrophie musculaire (poussins, bétail).

Le sélénite n'a aucun effet préventif dans :

- la résorption foetale (rats) ;
- l'hémolyse in vitro (en l'absence de glucose) ;
- l'encéphalomalacie ? (poussins) ;
- la dépigmentation des dents ? (rats) ;
- le brunissement des graisses (rats, poussins) ;
- le brunissement de l'utérus (rats) ;
- la baisse du stockage hépatique de la vitamine A (rats, poussins) ;
- et l'autolyse rénale (rats).

La cystine et la méthionine ont un effet préventif dans :

- la dystrophie musculaire (poussins) ;
- l'intoxication au tétrachlorure de carbone (rats).

Les AGI sont essentiels pour le développement de :

- la dépigmentation des dents (rats) ;
- l'encéphalomalacie (poussins) ;
- le brunissement des graisses (rats, poussins) ;
- la diminution du stockage hépatique de la vitamine A (poussins) ;
- et l'autolyse rénale (rats).

Les AGI ne sont pas indispensables pour le développement de :

- l'hémolyse in vitro (rats, poussins) ;
- l'intoxication au tétrachlorure de carbone (rats) ;
- la dystrophie musculaire (poussins) ;
- la nécrose du foie (rats) ;
- la diathèse exsudative (poussins) ;
- et le brunissement de l'utérus (rats).

L'effet antioxydant de la vitamine E est indispensable pour la protection contre :

- l'hémolyse ;
- la dépigmentation des dents ;
- l'encéphalomalacie ;
- le brunissement des graisses ;
- la diminution du stockage de la vitamine A ;
- et l'autolyse rénale.

On peut conclure que :

- le sélénium a un effet préventif dans certains syndromes de carence en vitamine E dont le développement ne nécessite pas la présence d'AGI ;
- par contre, le sélénium n'a aucun effet préventif dans les syndromes de carence en vitamine E qui nécessitent la présence d'AGI ;
- la vitamine E agit en tant qu'antioxydant dans certains syndromes nécessitant la présence d'AGI ;
- la vitamine E a d'autres fonctions ;
- le sélénium peut remplacer certains effets antioxydants de la vitamine E.

- EXPLICATIONS :

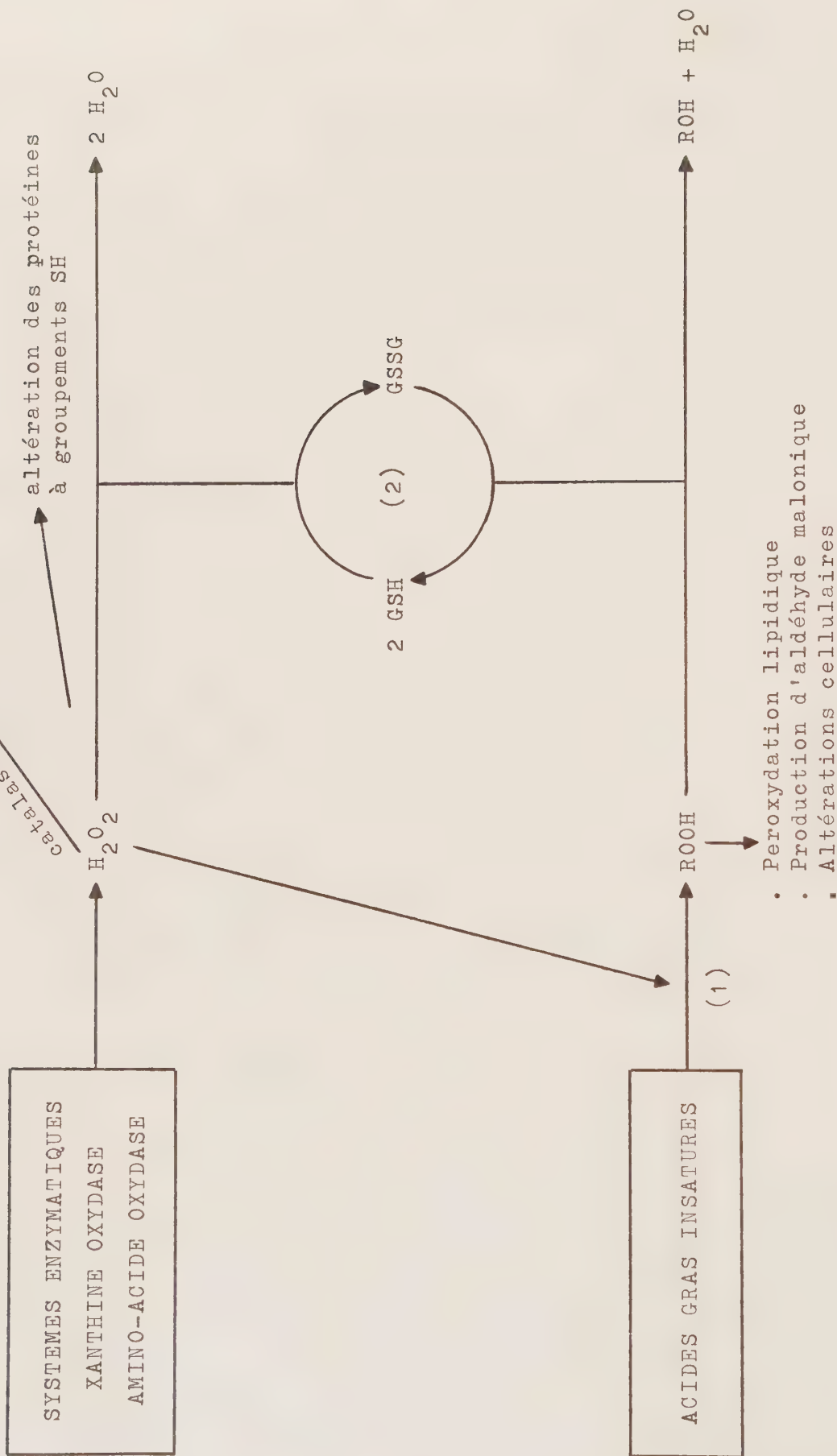
D'après HOEKSTRA (182), le sélénium, en tant que constituant de la GSH-Px, "catalyse la destruction de l'eau oxygénée, des hydroperoxydes lipidiques et d'autres hydroperoxydes", alors que "la vitamine E réduit la production" des hydroperoxydes, et en particulier les hydroperoxydes lipidiques. La vitamine E ne joue pas exclusivement le rôle d'antioxydant, mais permet de réduire la production des hydroperoxydes en favorisant le métabolisme de leurs précurseurs.

Ainsi :

- 1) Lors d'une carence en vitamine E et en sélénium, les organes et les tissus où le métabolisme cellulaire est associé à une forte production d'eau oxygénée, et en particulier ceux où la peroxydation lipidique a lieu à cause de leur teneur élevée en AGI, sont les plus sensibles et les plus susceptibles de dégénérescence, par exemple : foie du rat. La vitamine E et le sélénium, dans ce cas, ont un effet préventif séparément, la vitamine E par la réduction de la production d'eau oxygénée et d'hydroperoxydes, et le sélénium en catalysant leur réduction.
- 2) Lorsque les teneurs en sélénium sont normales, devant une carence en vitamine E, la capacité de "destruction" d'hydroperoxydes est dépassée dans les organes à faible teneur en GSHPx (cerveau des poussins, placenta du rat), mais reste inchangée dans les organes à fortes teneurs en GSHPx (foie du rat). On observe ainsi une dégénérescence cérébrale (encéphalomalacie) et une résorption foetale. Ces lésions ne sont pas prévenues par administration de sélénium, mais uniquement par la vitamine E.
- 3) Lorsque les teneurs en vitamine E sont normales, devant une carence en sélénium, la production d'hydroperoxydes et, par conséquent, l'altération des membranes cellulaires, ne se produisent pas (sauf certains organes probablement pauvres en catalases, comme le pancréas).
- 4) Chez les espèces dont certains organes sont caractérisés par une forte production d'eau oxygénée, les lésions sont observées dans l'un ou l'autre cas de carence (foie du rat). En effet, certaines espèces diffèrent entre elles par l'activité et la teneur en xanthine oxydase hépatique génératrice de l'eau oxygénée (élevées chez les rats, faibles chez les oiseaux). Chez ces derniers, on n'observe jamais de nécrose hépatique.
- 5) Lorsque l'hydroperoxyde (ROOH) est réduit, normalement il n'y a pas formation d'aldéhyde malonique, car absence de peroxydation lipidique. Cette réaction est observée in vivo au niveau du foie du rat, en présence d'une teneur normale en sélénium, malgré la carence en vitamine E.

In vitro, en l'absence de glucose, le GSH n'est pas régénéré d'une manière suffisante. Il y a baisse de l'activité de la GSHPx. Il en résulte le phénomène de peroxydation lipidique. Ce phénomène disparaît à la suite d'addition de glutathion au milieu.

Lors d'une carence en vitamine E et en sélénium, l'aldéhyde malonique est produite in vivo et réagit avec les fonctions aminées des protéines et des phospholipoprotéines pour donner des bases de Schiff colorées (pigments).



La vitamine E bloque la réaction (1).

Se, constituant de la GSHPx, catalyse la réaction (2).

- 6) Ce mécanisme explique l'effet exercé par la vitamine E sur les besoins de l'organisme en sélénium. Lorsque l'apport en vitamine E n'est que modéré, les hydroperoxydes sont davantage synthétisés, nécessitant ainsi la présence d'une teneur plus élevée en GSHPx, donc en sélénium. Par contre, lorsque l'apport en vitamine est largement suffisant, il y a moins d'hydroperoxydes. Par conséquent, les besoins en GSHPx, donc en sélénium, sont moins importants.
- 7) L'effet inverse, c'est-à-dire du sélénium sur les besoins en vitamine E, peut être expliqué par le fait que lors d'une carence relative en sélénium, l'activité de la GSHPx baisse, ce qui entraîne une réduction de la destruction des hydroperoxydes. Dans ces conditions, des teneurs élevées en vitamine E seront nécessaires pour freiner la production d'hydroperoxydes. Par contre, lorsque l'apport en sélénium est suffisant, l'activité de GSHPx est optimale et moins de vitamine E sera nécessaire pour contrôler les teneurs cellulaires en hydroperoxydes.
- 8) L'action des acides aminés soufrés sur les besoins en vitamine E et en sélénium peut être expliquée par le fait que la cystéine est un précurseur du glutathion. Ceci a une importance lorsque l'apport en sélénium et en vitamine E atteint un seuil minimal tolérable.

10.2. CADMIUM ET SELENIUM -

10.2.1. - Effet du sélénium sur le cadmium :

Après la mise en évidence de la toxicité du cadmium administré par voie parentérale aux rats et résultant en une nécrose testiculaire (201), et après la découverte de l'effet protecteur du zinc à ce niveau, MASON et YOUNG (259) ont attiré l'attention sur l'effet protecteur du sélénite de sodium chez le rat. GUNN (144) a observé le même effet chez la souris.

Le rôle du sélénium dans la gamétogénèse est évident (40, 145). L'action protectrice du sélénite et de la sélénométhionine n'est cependant pas limitée à l'atteinte testiculaire. L'administration des dérivés séléniés fournit une protection plus ou moins complète vis-à-vis d'autres effets toxiques du cadmium, dont :

- l'atteinte ovarienne ;
- l'atteinte du placenta ;
- et les effets mutagène et tératogène.

L'administration de sélénite entraîne une baisse du taux de mortalité chez les animaux qui ont reçu une dose létale en sels de cadmium.

10.2.2. - Effet du cadmium sur le sélénium :

L'administration par voie parentérale des sels de cadmium diminue d'une manière nette l'excrétion pulmonaire des métabolites volatils du sélénium.

Le cadmium agit en contrecarrant l'effet toxique du sélénium évalué par le retard de la croissance et le taux de mortalité (180).

Le mécanisme d'action le plus probable serait la formation d'un chélateur entre le cadmium et le sélénium, expliquant l'effet protecteur de l'un sur l'autre.

10.3. MERCURE ET SELENIUM -

10.3.1. - Effet du sélénium sur le mercure :

10.3.1.1. Mercure minéral :

PARIZEK et OSTADLOVA ont observé pour la première fois, en 1967 (304), l'effet protecteur du sélénite de sodium lors d'une intoxication par le chlorure mercurique. L'expérience a été réalisée sur plusieurs lots de rats mâles et de rats femelles. Ils ont noté l'absence de modifications histopathologiques provoquées par une intoxication, au niveau des reins et de l'intestin. Le sulfite de sodium, administré parallèlement à un autre lot de rats, n'a eu aucun effet protecteur.

Dans une autre expérience, les animaux qui ont reçu une dose létale de mercure ont survécu à la suite de l'administration de dérivés séléniés. L'effet protecteur du sélénium ne relève pas d'un mécanisme de stimulation de l'excrétion du mercure et de ses dérivés. Au contraire, on a remarqué que le sélénium favorise la rétention tissulaire du mercure (322) tout en modifiant sa distribution. On remarque aussi qu'il s'oppose au transfert placentaire du mercure et aussi du cadmium (303).

Après administration de sélénium, il y a élévation des teneurs plasmatiques et sanguines en mercure. Cette élévation dépend étroitement de la dose administrée, elle est observée à très faible dose et même à la suite de l'administration du sélénium par voie orale.

10.3.1.2. Dérivés organo-mercuriels : méthyl-mercure :

GANTHER (130), en 1972, a démontré l'effet protecteur du sélénium présent dans la nourriture de la caille (*Coturnix coturnix japonica*) vis-à-vis du méthyl-mercure présent dans cette même nourriture à une teneur voisine de 20 ppm en mercure. Il en est de même chez les rats nourris par rations contenant 100 ppm de mercure (méthyl-mercure), auxquels l'administration du sélénium dans la nourriture a permis de prolonger la survie au-delà de la sixième semaine.

Cette même observation a été réalisée par POTTER (322), un an plus tard.

GANTHER a émis l'hypothèse de la possibilité de prévenir l'intoxication alimentaire au méthyl-mercure par addition de sélénium.

- CONCLUSION :

Il est important de savoir :

- dans quelle mesure le sélénium peut modifier la distribution, la rétention et le métabolisme des dérivés organo-mercuriels retenus au niveau du système nerveux central et, par suite, leur toxicité ;
- le mécanisme d'action du sélénium permettant de contre-carrer l'effet toxique du mercure et de ses métabolites.

10.3.2. - Effet du mercure sur le sélénium :

10.3.2.1. Association diphényl-sélénium - acétate de phényl-mercure :

HILL (180) a observé une baisse de la toxicité du sélénite de sodium et de certains dérivés organo-séléniés lorsqu'ils se trouvent associés à l'acétate de phényl-mercure dans la nourriture des poussins. Une réponse optimale est observée pour un rapport : diphényl-sélénium/acétate de phényl-mercure = 1.

La toxicité relative à l'acétate de phényl-mercure diminue en présence de diphényl-sélénium. Le rapport correspondant à une réponse optimale est de 4/1.

Ceci montre, selon l'auteur, que le mécanisme d'action est différent dans les deux cas.

10.3.2.2. Effet de l'administration du mercure sur la toxicité des métabolites méthylés du sélénium :

D'après PARIZEK (303), à l'opposition de ce qui a été observé chez les espèces femelles ayant reçu une injection de sélénite de sodium quelques heures après l'administration d'un sel de mercure, l'administration de ces

derniers dans un ordre complètement inversé augmente d'une manière remarquable la toxicité du sélénium, en particulier chez les mâles. Des travaux ultérieurs ont montré que l'exposition simultanée au chlorure mercurique et au sélénite augmente la toxicité du diméthyl-sélénium et, de la même manière, celle du triméthyl-sélénium. La formation de ces métabolites est cependant inhibée par l'administration préalable d'un sel de mercure.

10.4. ARSENIC ET SELENIUM -

L'arsenic s'oppose à la toxicité chronique des grains sélénifères et du sélénite de sodium chez diverses espèces (98, 329).

Administré sous forme d'arsénite de sodium, il favorise l'excrétion gastro-intestinale du sélénium administré sous forme de sélénite (129) ou de séléniat de sodium aux rats (234). On observe un accroissement de la teneur en sélénium de la sécrétion biliaire (234). Le sélénium a le même effet sur la sécrétion biliaire de l'arsenic (233).

L'arsénite entraîne une baisse de la teneur en sélénium du sang, du foie, et diminue l'excrétion pulmonaire d'une dose aiguë de sélénite de sodium (129). Par contre, l'élimination urinaire n'est pas modifiée.

Le mécanisme d'action demeure inconnu.

Le sélénium s'oppose à l'effet tératogène du sulfate de cadmium et de l'arséniate de sodium séparément, administrés au hamster pendant la période de gestation (183). La réponse optimale est observée lorsque le sélénite de sodium est administré avant ou en même temps que le dérivé tératogène. La protection est beaucoup moins efficace lorsque l'administration du dérivé tératogène précède celle du sélénium.

10.5. THALLIUM, PLOMB ET SELENIUM -

Le thallium favorise la fixation hépatique et rénale du sélénium, et diminue l'excrétion pulmonaire d'une dose subaiguë de sélénite de sodium.

Le plomb et le thallium n'ont aucun effet sur l'excrétion gastro-intestinale du sélénium (232).

11. REVUE DES PRINCIPALES METHODES

D'ANALYSE QUANTITATIVE DU SELENIUM

11.1. ECHANTILLONNAGE -

Le prélèvement d'échantillons de divers milieux biologiques (organes - liquides biologiques - végétaux) ne pose aucun problème. Ces échantillons peuvent être minéralisés directement ou après dessiccation. Dans le dernier cas, il faut éviter une température trop élevée ($> 70^{\circ}\text{C}$) qui entraîne une perte en sélénium par volatilisation. La lyophilisation semble être la technique de dessiccation la plus convenable, elle a été utilisée par plusieurs auteurs (413). Le poids de l'échantillon varie de 100 mg à 100 g suivant les teneurs en sélénium et la méthode de dosage choisie. Mais lorsqu'il s'agit du dosage du sélénium dans l'eau, un volume de un à plusieurs litres, suivant le cas, est nécessaire car le sélénium existe à l'état de traces (ppb). Une préconcentration ou une coprécipitation est indispensable dans la majorité des cas (319, 380).

Par contre, le prélèvement et le dosage du sélénium dans l'air des ambiances professionnelles posent de sérieux problèmes, vu la volatilité importante des dérivés séléniés (acide sélénhydrique, dioxyde de sélénium ...). Le sélénium existe dans l'air à l'état de particules liquides et solides très fines assimilées à un gaz, les tensions de vapeur de certains dérivés séléniés sont suffisamment élevées pour entraîner des pertes significatives au cours du prélèvement.

Plusieurs méthodes de prélèvement ont été essayées. Nous résumons ici les principaux travaux réalisés dans ce domaine au cours des dix dernières années.

11.1.1. - Filtration :

STAHL (402) a préconisé l'usage de papiers filtres à porosité d'un micron. Le volume d'air est de 100 m^3 .

SHENDRIKAR et WEST (380) ont utilisé des filtres Millipore et en fibres de verre, et ont évalué les pertes en sélénium qui variaient entre 19 et 38 % selon le cas.

PILLAY et ses collaborateurs (316) ont étudié les pertes en sélénium au cours du passage de l'air à travers la membrane Millipore : 56 % en moyenne du sélénium contenu dans l'air n'est pas retenu par le filtre.

11.1.2. - Impinger :

L'air barbote dans un liquide absorbant qui peut être :

- L'EAU : la méthode est très efficace. Elle a été essayée par SHENDRIKAR et WEST (380) pour le dioxyde de sélénium présent dans la fumée de cigarette. Cette technique est aussi valable pour un volume d'air important.
- SOLUTION AQUEUSE D'ACIDE BROMHYDRIQUE (40-48 %) ET DE BROME (5-10 %) (202) : l'avantage de cette solution est qu'elle permet de convertir la majeure partie des dérivés sélénisés en dérivés tétrabromés solubles. La solution peut être analysée directement après élimination du brome et neutralisation.

11.1.3. - Précipitation électrostatique.

11.2. TRAITEMENT CHIMIQUE DE L'ECHANTILLON :

MINÉRALISATION -

L'isolement du sélénium d'un milieu biologique nécessite au préalable la destruction de la matière organique et l'obtention d'un milieu exclusivement composé de substances minérales. Cette étape est très délicate car les réactions sont parfois violentes et risquent de provoquer l'entraînement de quantités notables du sélénium recherché.

11.2.1. - Minéralisation par voie sèche :

11.2.1.1. Calcination :

ROBINSON, WILLIAMS, DUDLEY et BYERS (334) détruisent les matières organiques végétales en présence de nitrate de magnésium. Ils opèrent sur une prise d'essai de 100 g de substance végétale triturés avec 25 g de nitrate de magnésium et additionnés de 5 g d'oxyde de magnésium. Le mélange est réchauffé sur un bec bunsen, puis porté au four à moufle jusqu'à cendres blanches.

ROQUEBERT et TRUHAUT (336) effectuent un début de minéralisation en chauffant la matière organique avec l'eau oxygénée à 110 volumes (0,6 ml d'eau oxygénée par gramme de matière) et l'acide nitrique (0,6 ml d'acide nitrique par gramme de matière). La destruction de la matière organique est achevée par calcination en milieu alcalin en présence de nitrate de magnésium.

- DISCUSSION :

Le rendement de la méthode est faible, surtout lorsqu'il s'agit de teneurs inférieures à 10 µg par prise d'essai. En effet, pour une prise d'essai de 5 ml de sang à laquelle 5 µg de sélénium ont été ajoutés sous forme de sélénite de sodium, le rendement ne dépasse guère 70 % (335).

11.2.1.2. Combustion à l'oxygène : fiole de Schoeniger :

REFERENCE	MILIEU
DYER (105)	Plantes Tissus animaux
ALLAWAY et CARY (10)	Tissus animaux Lait
TAUSSKY et coll. (413)	Tissus animaux Urines Lait

- DISCUSSION :

L'échantillon doit être desséché au préalable. La dessiccation par lyophilisation permet d'éviter les pertes en sélénium par volatilisation lorsque l'échantillon est porté à haute température.

Le rendement de la méthode est relativement faible, comparé aux techniques de minéralisation par voie humide. Le sélénium n'est pas complètement libéré à partir du résidu de combustion, même après une agitation de trente minutes (380).

La plupart des papiers filtres contiennent du sélénium. Ceci pose de sérieux problèmes lorsqu'il s'agit du dosage de ce métalloïde à l'état de traces.

Nécessité d'éliminer l'oxygène de la solution : l'oxygène est un oxydant vis-à-vis des réactifs organiques de complexation. Il entraîne une baisse de la sensibilité en cas de dosage fluorimétrique.

11.2.2. - Minéralisation par voie humide :

Le tableau suivant donne la liste des mélanges d'acides proposés par différents auteurs et des milieux dans lesquels le sélénium a été dosé.

REFERENCE	MELANGE DE MINERALISATION	MILIEU
VERIMONT (425)	acide sulfurique 25 ml oxyde mercurique 0,7 g	Urines (100 ml)
BONHORST (36)	acide sulfurique 25 ml acide nitrique 25 ml oxyde mercurique 0,1 g	Tissus animaux Lait (30 à 50g) (10 g en cas de matière sèche)
HANDLEY (160)	acide sulfurique 1 ml acide nitrique 5 ml acide perchlorique 1 ml	Milieux biologiques (1 g)
HALL (153)	acide nitrique 40 ml eau oxygénée (100 U) 5 ml acide perchlorique 5 ml	Plantes (5 g)
IHNAT (188, 189)	acide nitrique 10 ml acide perchlorique 6 ml acide sulfurique 5 ml eau oxygénée (30 %) 1 ml	Aliments (<1 g)
DOMENECH (97)	acide sulfurique 5 ml acide nitrique 5 ml ou acide nitrique 14 ml acide perchlorique 6 ml	Colorants alimentaires (2-5 g)
WATKINSON (434)	acide nitrique 10 ml acide perchlorique 5 ml	Plantes (Se > 0,02 µg)
CUMMINS (82)	5 ml du mélange : eau 150 ml molybdate de sodium 10 g acide sulfurique 160 ml acide perchlorique 200 ml	Tissus animaux (0,5 - 1 g) et (0,1 - 0,2 g si matière sèche)
WATKINSON (436)	acide nitrique 5 ml acide perchlorique 2 ml	Plantes (1 g) Sang (1 ml)

REFERENCE	MELANGE DE MINERALISATION	MILIEU
OLSON (296)	acide nitrique 10 ml acide perchlorique 2 ml	Plantes (1 g)
OLSON, LEISURE (228)	acide nitrique 10 ml acide perchlorique 2,5 ml	Plantes ($<1,5$ g)
TABOR (408)	acide nitrique 10 ml acide perchlorique 1 ml	Atmosphère
BEAL (25)	acide nitrique 6 ml acide perchlorique 2 ml acide sulfurique 5 ml eau oxygénée 1 ml	Poissons (2 g)
NIVIERE (285)	acide phosphorique 1/3 10ml acide nitrique 5 ml acide chlorhydrique 5 ml acide perchlorique 10 ml	Aciers (1 g)

- DISCUSSION :

Bien que les pouvoirs oxydant et destructeur d'un mélange contenant de l'acide sulfurique soient supérieurs à ceux d'autres mélanges d'acides utilisés, ce mélange présente plusieurs inconvénients, dont :

- le phénomène de carbonisation qui est souvent observé. La carbonisation entraîne une perte de quantités appréciables de sélénium (82, 434) ;
- la température de digestion est supérieure à celle du mélange nitro-perchlorique. Ceci peut entraîner une perte en sélénium qui vient s'ajouter à celle observée lors de la carbonisation ;
- la nécessité d'utiliser de l'acide sulfurique "Suprapur". L'acide sulfurique normal pur pour analyse peut contenir du sélénium à l'état de traces.

11.3. SEPARATION -

Certains auteurs effectuent le dosage du sélénium directement dans le minéralisat (25, 105, 188, 296).

D'autres considèrent comme indispensable l'isolement préalable. Plusieurs techniques ont été proposées :

- a) Séparation par distillation en présence de brome et d'acide bromhydrique. Le sélénium distille à l'état de tétrabromure et hexabromure de sélénium et de dibromure disélénium Se_2Br_2 (160, 210, 334, 335 ...) ;
- b) Séparation par réduction et précipitation à l'état de sélénium élémentaire. La précipitation se fait par :
 - . le chlorhydrate d'hydroxylamine (7) ;
 - . l'acide ascorbique (280).
- c) Séparation par coprécipitation avec l'arsenic (345).
- d) Séparation par extraction avec le dithiol zinc (351).
- e) Séparation par passage sur une résine échangeuse d'ions. Comme résine, on utilise :
 - . le DOWEX 50 WX 8 (50-100 mesh) (242, 408) ;
 - . l'IRA 200 (17).

Le passage sur résine permet d'éliminer les interférences du fer (III) et du cobalt (II).

11.4. DOSAGE -

11.4.1. - Dosage volumétrique :

11.4.1.1. Dosage acidimétrique :

L'acide sélénique se comporte comme un diacide fort. Il est dosé par la soude en présence de phénolphtaléine.

L'acide sélénieux est un diacide. La première acidité est neutralisée à $\text{pH} = 5,23$, la seconde à $\text{pH} = 10,35$. L'indicateur convenable est le pourpre de bromo-crésol.

Cette méthode est inapplicable au microdosage. Elle n'est applicable qu'au dosage des acides sélénique et sélénieux en solution pure.

La réduction est réversible. Elle est quantitative en milieu très acide et à chaud si on distille l'halogène au fur et à mesure de sa formation. L'halogène libéré est titré par le thiosulfate de sodium.

- REDUCTION DE L'ACIDE SELENIEUX :

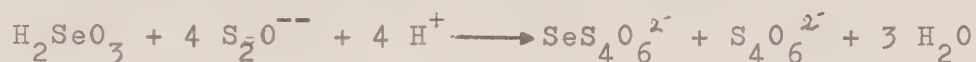
- . Réduction par l'iodure de potassium :



La réduction se fait en milieu acide chlorhydrique. L'iode libéré est titré par le thiosulfate.

Bien que la réaction soit complète, il faut utiliser un grand excès d'iodure de potassium.

- . Réduction par le thiosulfate de sodium :



La réaction a lieu en présence d'acide chlorhydrique et en présence d'un excès connu de solution titrée de thiosulfate. L'excès de thiosulfate est dosé par l'iode.

KLEIN (210) a utilisé cette technique pour le dosage du sélénium dans les plantes, le sol, les eaux et les milieux biologiques. Après attaque de la matière organique avec un mélange nitro-sulfurique, le sélénium est séparé par distillation en présence de brome et d'acide bromhydrique, puis réduit à l'état élémentaire par le chlorhydrate d'hydroxylamine. Le précipité est repris par un mélange de brome et d'acide bromhydrique. L'excès de brome est réduit par addition d'une quantité connue de thiosulfate de sodium, dont l'excès est dosé par l'iode en présence d'amidon.

La sensibilité de la méthode est faible, la limite de détection est de 10 µg par prise d'essai.

11.4.2. - Dosage gravimétrique :

11.4.2.1. Dosage à l'état de sel :

- PRECIPITATION A L'ETAT DE SELENIATE DE PLOMB :

En milieu acétique, l'acide sélénique précipite à l'état de séléniate de plomb par l'acétate de plomb. Le précipité est filtré, lavé, séché et pesé (397). La limite de sensibilité est de 100 mg par prise d'essai. L'erreur est de 1 %.

- PRECIPITATION A L'ETAT DE SELENITE D'ARGENT :

BECKURT (27) dose le sélénium dans les composés organiques après destruction par l'acide nitrique en présence de nitrate d'argent. Le sélénite d'argent est isolé et pesé.

- PRECIPITATION A L'ETAT DE SELENITE DE MERCURE.

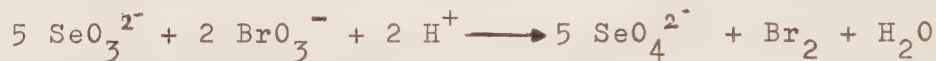
11.4.1.2. Dosage par oxydation :

- OXYDATION DE L'ACIDE SELENIEUX :



L'oxydation se fait :

- par le permanganate de potassium en excès en milieu acide sulfurique dilué (385). Les auteurs opèrent en présence d'acide phosphorique, sinon l'acide sélénieux réduirait le permanganate en bioxyde de manganèse MnO_2 peu soluble, qui serait ensuite difficilement réduit par les ions ferreux. L'acide phosphorique permet de maintenir le manganèse en solution sous forme de complexe ;
- par le chromate de potassium en milieu acide nitrique. ADAMS et GILBERSTON (2) utilisent un excès de bromate et dosent l'excès par une solution d'arsenite de sodium à 0,1 N en présence d'indicateur :



- OXYDATION DU SELENIUM ELEMENTAIRE :

L'oxydation se fait :

- par l'iodate de potassium (77). Les réactions sont les suivantes :



Lorsque tout le sélénium est oxydé, la solution devient brune par suite de la présence d'iode en solution. On décolore la solution en continuant à ajouter de l'iodate de potassium décinormale. Pour mieux voir la fin de la réaction, on opère en présence de tétrachlorure de carbone ;

- par le bromate de potassium (376). Le sélénium est transformé à l'état de sélénite dosé soit par le permanganate, soit par le chromate de potassium.

11.4.1.3. Dosage par réduction :

- REDUCTION DE L'ACIDE SELENIQUE :

La réduction est effectuée par l'acide chlorhydrique ou l'acide bromhydrique concentré :



11.4.2.2. Dosage à l'état de sélénium élémentaire :

Le sélénium est séparé par réduction. Le précipité est filtré sur du verre fritté, lavé, séché à 100-150°C et pesé. Les réducteurs utilisés sont nombreux, et chaque auteur a sa préférence pour l'un d'entre eux.

Comme réducteurs, il existe :

- L'hydrazine et ses sels :



SHIGEKI (382) opère en milieu perchlorique 3,2 à 5,1 M. La réaction peut se faire soit à température ambiante, soit au bain-marie bouillant. Dans les deux cas, la précipitation est complète.

- Phényl hydrazine : le chlorhydrate de phényl hydrazine précipite le sélénium d'une solution diluée et froide. La précipitation est cependant incomplète.

- L'hydroxylamine :



ROBINSON (334) précipite le sélénium d'une solution bromhydrique par le chlorhydrate d'hydroxylamine.

- L'anhydride sulfureux : l'anhydride sulfureux réduit en milieu acide et à chaud l'acide sélénieux. La réaction commence instantanément à une température peu élevée. Il n'y a pas de pertes par entraînement gazeux, ni par volatilisation.

CALEY (58) a étudié avec détail la réduction de l'acide sélénieux par l'anhydride sulfureux et les conditions pour obtenir une sensibilité maximale. Cette sensibilité est affectée par la concentration en ions (H^+) et par la température. On peut opérer en milieu chlorhydrique dilué, toutefois, il ne faut pas utiliser l'acide chlorhydrique pour le dosage de l'acide sélénieux en présence d'acide sélénique car une forte concentration en ions chlorures en milieu acide réduit l'acide sélénique en acide sélénieux. Il vaut mieux opérer en présence d'acide sulfurique qui ne présente pas cet inconvénient. La concentration optimale en acide sulfurique est de 5,5 M et la température optimale est de 80 à 90°C. La limite de détection est supérieure à 1 mg par 100 ml.

- La thio-urée, le chlorure stanneux et le chlorure de titane, ont été aussi utilisés. La réduction s'effectue en milieu acide.

11.4.3. - Méthode au four annulaire :

Cette méthode a été décrite par WEST et CIMERMAN (442). Elle s'applique au dosage du sélénium dans l'air. La coloration est basée sur la réaction entre l'acide sélénieux et le chlorhydrate de diamino-3,3'-benzidine. Le domaine d'application est de 0,1 à 0,5 µg avec une erreur relative de 5 %.

11.4.4. - Dosage colorimétrique :

11.4.4.1. Particules en suspension :

On utilise la coloration du sélénium précipité à l'état colloïdal.

Il existe différentes techniques qui permettent de doser des quantités de sélénium allant de 50 µg à 5 mg par gramme de prise d'essai. Toutes ces méthodes diffèrent l'une de l'autre par l'agent réducteur utilisé. On distingue :

- LA REDUCTION PAR LE CHLORHYDRATE D'HYDROXYLAMINE : cette méthode a été proposée par ROBINSON (334) qui réalise la réduction d'une solution bromhydrique d'acide sélénieux par le chlorhydrate d'hydroxylamine en opérant une heure au bain-marie, après quoi la solution, protégée par de la gomme arabique qui permet de stabiliser le sol de sélénium, est abandonnée une nuit avant d'être comparée à des témoins.
- LA REDUCTION PAR LE CHLORHYDRATE D'HYDRAZINE : LEONTOVITCH (229) a établi les conditions favorables de réduction des composés oxygénés du sélénium par le chlorhydrate d'hydrazine en milieu acide formique 6 N. Il utilise comme colloïde protecteur l'alcool polyvinylique. La réaction se fait au bain-marie à 93-95°C. L'absorbance est déterminée par spectrophotométrie ultra-violette. Le domaine d'application s'étend de 2 à 20 µg par ml.
- LA REDUCTION PAR L'ACIDE ASCORBIQUE (94) : la réduction de l'acide sélénieux par l'acide ascorbique en milieu acide s'effectue en présence de chlorhydrate de chlorpromazine qui stabilise le sol de sélénium. L'absorption est mesurée à 420 nm.

11.4.4.2. Libération d'iode :

La réduction de l'acide sélénieux peut s'effectuer par l'iodure de potassium. L'iode libéré est dosé colorimétriquement soit directement à 352 nm, soit après addition d'empois d'amidon à 615 nm. Le domaine d'application, selon les auteurs (220), s'étend de 0,5 à 20 µg par ml. La méthode est applicable sur les eaux.

11.4.4.3. Coloration donnée avec les réactifs organiques :

Le sélénium donne, avec un grand nombre de réactifs organiques, des composés colorés. Parmi ces réactifs, certains ont servi à identifier le sélénium, c'est le cas de la codéine (coloration bleue-verte), la morphine (coloration bleue passant au vert à chaud), le pyrrole (coloration bleue-verte), d'autres sont utilisés pour doser quantitativement le sélénium. Le tableau (à la page suivante) donne la liste de ces réactifs avec certaines conditions opératoires relatives à ces derniers.

- DISCUSSION :

La sensibilité et la limite de détection sont médiocres. Ces méthodes ne s'appliquent pas au dosage de faibles quantités de sélénium dans les milieux biologiques et les eaux.

11.4.5. - Spectrofluorimétrie :

Plusieurs réactifs ont été proposés pour le dosage du sélénium par spectrofluorimétrie, dont :

- la diamino-3,3'-benzidine (413, 435) ;
- la diamino-2,3-naphtalène (296, 305, 377) ;
- et la diamino-4,5-naphtalène (305).

La sensibilité et la limite de détection sont bonnes et varient d'un auteur à un autre (appareillage, milieu, conditions opératoires).

La spectrofluorimétrie a été appliquée au dosage du sélénium dans les tissus animaux, les aliments et les végétaux. La méthode au diamino 2,3 naphtalène est reconnue par l'A.O.A.C. comme méthode officielle pour le dosage du sélénium dans les plantes.

C'est le dosage spectrofluorimétrique que nous avons étudié en détail et que nous avons appliqué aux urines et aux eaux.

11.4.6. - Dosage catalytique :

L'effet catalytique du sélénium sur certaines réactions d'oxydation et de réduction de dérivés organiques et minéraux a été étudié, à plusieurs reprises, par un grand nombre d'auteurs. FEIGL et WEST (113), en 1947, ont étudié certains de ces dérivés, citons les chromates, l'acide picrique, le dichlorophénol, l'indophénol, la cacothéline et le bleu de méthylène. Seul ce dernier a été retenu.

- BLEU DE METHYLENE : la méthode a été décrite par FEIGL et WEST en 1947 (113). Elle est basée sur la catalyse par le sélénium à l'état élémentaire de la réaction de réduction du bleu de méthylène par le sulfure de sodium. Elle a été revue en 1968 par WEST et RAMAKRISHNA (443) dans le but de l'appliquer au dosage quantitatif du sélénium.

DERIVE NOMENCLATURE	FORMULE BRUTE	STRUCTURE
DIAMINO 3,3' BENZIDINE	$C_{12}N_4H_{14}$	
1,1'DIANTHRIMIDE (1,1' DIANTHRACHINOYLAMINE)	$C_{28}O_4NH_{15}$	
MERCAPTO-2-BENZIMIDAZOLE	$C_7N_2SH_6$	
DITHIZONE	$C_{13}ON_4H_{12}$	
DIMETHYL-AMINO-4-O-PHENYLENE DIAMINE	$C_8N_3H_{13}$	
PHENYL-1-THIO-SEMICARBAZIDE	$C_7N_3SH_9$	
DIAMINO 4,5 THIO-6-PYRIMIDINE	$C_4N_4SH_5$	
DIPHENYL-1,1-HYDRAZINE	$C_{12}N_2H_{12}$	
BISMUTHIOL : MERCAPTO-5-PHENYL-3-THIAZOLE- 1,3,4-THIONE-2	$C_7N_2S_3H_6$	
DIAMINO-2,3-NAPHTHALENE	$C_{10}N_2H_{10}$	
DIAMINOCHRYSAZINE : DIAMINO-1,8-DIHYDRO-4,5-XANTHRAQUINONE	$C_{12}O_4N_2H_{10}$	

λ MAXIMUM D'ABSORPTION (en nm)	DOMAINE D'APPLICATION	REMARQUES	REFERENCE
420	0,1 - 10 µg/ml	Extraction par le toluène Interférences : Au, Bi, Cr, Mo, Sn, V, W, Zn et agents oxydants	(69, 82, 285)
480, 585	0,02 - 0,25 mg/25 ml	Interférences : B, Be, Te, Br ⁻ et F ⁻	(222)
420	10 - 20 µg/ml	Extraction par un mélange BuOH - CHCl ₃ 1 : 5 Interférences : Bi, Cu, BrO ₃ ⁻ et IO ₃ ^N	(50)
420	0,02 - 1 µg/ml	Extraction par CCl ₄ à partir d'un milieu HCl 6 N Interférences : Cu et Hg	(255)
500	2 - 20 µg/ml	Interférences : Fe ³⁺ , Cu ⁺⁺ , Co ⁺⁺ et Cr ³⁺⁺	(90)
320	-	Extraction à pH = 1 par isoBuOH ou isoamylol Interférences : Fe, Cu et U	(51)
380	0,1 - 2,5 µg/ml	Interférences : Fe ⁺⁺ , Fe ³⁺ , Cu et BrO ₃ ⁻ Coloration instable (30 minutes)	(67)
530	1.10 ⁴ - 7.10 ⁴ M/PE	Extraction par le CHCl ₃ à partir d'HCl 1 N Interférences : Cu ²⁺ , Fe ³⁺ , W ⁶⁺ , V ⁵⁺ et H ₂ O ₂	(276)
410	5 - 100 mg/ml	Extraction par le CCl ₄ Interférences : Te, Cu et Fe	(403)
380		Extraction par le toluène à pH = 1,5 - 2,5 Interférences : Cu, hypochlorite et agents réducteurs	(242)
610	4,3 ppm	Milieu acide sulfurique 99,8 - 100 %	(41)

La méthode est simple, rapide, et ne nécessite aucun appareillage. Elle est de sensibilité moyenne (0,01 à 0,1 µg/ml). Cependant, la précision est médiocre puisque la détection du point d'équivalence se fait visuellement. Il faut noter aussi l'interférence de certains cations : cuivre, argent, bismuth et antimoine.

Elle a été utilisée pour le dosage du sélénium dans l'air (381).

- TETRAAZA-1,4,6,11-NAPHTACENE : le sélénium (Se IV) catalyse la réaction de réduction du tétraaza-1,4,6,11-naphtacène en dihydro-1,6-tétraaza-1,4,6,11-naphtacène. Le dosage se fait par la mesure de l'absorbance à 600 nm (203).

La réaction est simple, rapide et sensible (0,005 à 0,035 µg de Se/ml). La précision est bonne.

On a observé cependant l'interférence d'un grand nombre d'éléments : Ba^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , V^{5+} , W^{6+} , Bi^{2+} et Te^{4+} .

- CHELATE FER (II) - ACIDE ETHYLENE DIAMINE TETRACETIQUE : cette méthode est récente, elle date de 1974 et est basée sur le phénomène de catalyse par les ions sélénites de la réaction d'oxydation du complexe Fe (II) - EDTA par les ions nitrates (212). Certaines conditions doivent être respectées : le pH doit être maintenu entre 1,5 et 4, la concentration en nitrate de sodium doit être de 2,3 M et celle de Fe (II) - EDTA de 4.10^{-2} M. La température optimale est de 25°C.

La méthode est rapide et la limite de détection est bonne : 3.10^{-3} µg/ml. Aucune interférence de la plupart des cations n'a été observée, à l'exception du rhenium à 1 µg/ml. Parmi les anions, seuls les nitrites interfèrent à une concentration supérieure à 25 µg/ml (212).

Les mêmes auteurs ont décrit et étudié l'effet catalytique des ions sélénites sur la réaction d'oxydation du chélate Mn (II) - EDTA par l'eau oxygénée. La limite de détection de cette méthode est encore meilleure : 3.10^{-4} µg/ml, mais l'erreur relative est plus importante.

- BROMURE D'ARGENT : cette méthode a été mise au point par MALKOVA et KAPLAN en 1973 (258) pour le dosage des ions sélénieux Se^{2-} . Il s'agit de la catalyse par ces ions de la réaction de réduction du bromure d'argent par le méto1-hydroquinone. La concentration en ions sélénieux est déterminée visuellement à partir de la quantité d'argent libérée sur la plaque photographique (tache plus ou moins noire), et cela en comparant à une série de taches témoins.

La réalisation de cette technique est délicate. La limite de détection est faible : 0,05 mg/ml. Il y a interférence d'un certain nombre d'éléments : S^{2-} , Au (III), Ir (IV), Pd (II) et Rh (III).

Elle permet cependant de doser les ions sélénieux en présence d'un excès d'ions sélénites.

11.4.7. - Spectrophotométrie d'émission :

WARING (432) a décrit une méthode de dosage du sélénium par spectrophotométrie d'émission. Cette méthode est restée peu utilisée à cause de sa faible sensibilité et de la limite de détection qui n'est pas suffisante pour déterminer de faibles quantités de sélénium. Les différents paramètres fixés par l'auteur sont les suivants :

- SOURCE D'EXCITATION : arc électrique continu - ddp 300 volts et circuit de 12 ampères.
- DEUX ELECTRODES EN GRAPHITE. La prise d'essai est placée dans une petite cavité (cratère) de l'électrode inférieure mélangée à de l'oxyde de cuivre (Cu_2O) qui permet d'augmenter l'intensité des deux raies auxquelles on effectue le dosage : 2039,85 et 2064,78 Å.
- DUREE D'EXCITATION : 90 secondes.
- LA DETECTION : on utilise une plaque photographique sensible au rayonnement ultra-violet.

Cette méthode a permis de doser le sélénium dans différents minerais à une teneur allant de 0,0015 % à 2 %.

11.4.8. - Absorption atomique :

11.4.8.1. Absorption atomique :

Le dosage du sélénium par spectrométrie d'absorption atomique a été réalisé, pour la première fois, par ALLAN en 1962 (9). Le spectre d'absorption de l'élément a été étudié en détail par CHAKRABARTI, plus tard (65). Dans ce spectre, quatre raies principales ont été identifiées, elles correspondent aux longueurs d'onde suivantes : 1960,26 Å ; 2076,79 Å ; 2062,79 Å et 2039,85 Å. La sensibilité de la méthode pour chacune de ces quatre raies a été déterminée séparément dans une flamme air-acétylène et air-hydrogène. Le maximum de sensibilité correspond à la raie 1960,26 Å.

L'usage de cette technique est resté peu répandu. En effet, la limite de détection et la sensibilité sont régies par deux facteurs importants :

- l'intensité et la stabilité relativement faibles de la plupart des lampes émettrices de raies utilisées ;
- l'absorption du sélénium à 1960 Å qui se situe dans l'ultra-violet lointain.

11.4.8.1.1. - SYSTEME EMETTEUR :

11.4.8.1.1.1. Lampe à cathode creuse :

La source la plus courante est la lampe à cathode creuse. La mise au point d'une telle lampe s'est heurtée à beaucoup de difficultés, vu la volatilité du sélénium. ALLAN (9) a réussi à utiliser une lampe à cathode creuse au

sélénium d'étain. Une telle lampe émet le spectre caractéristique sous forme de raie très fine et étroite. La stabilité n'est pas suffisante. Il en est de même pour la limite de détection qui varie de 0,2 à 1 ppm dans une flamme air-acétylène (200, 325).

11.4.8.1.1.2. Lampe à décharge - sans électrode :

Cette lampe a été utilisée par RANN et HAMBLY (325). La stabilité est bonne, mais la sensibilité n'est pas aussi grande que ce que l'on attendait puisqu'elle présente l'inconvénient d'émettre une raie assez large à mi-hauteur ($1 \text{ \AA}$), ce qui limite l'intensité de l'absorption.

11.4.8.1.1.3. Lampe à cathode creuse - haute intensité :

Elle est décrite par WATKINSON (437). Deux décharges électriques entraînent successivement l'atomisation et l'excitation du sélénium.

11.4.8.1.2. - LA FLAMME :

Le choix de la flamme se heurte, dans le cas du sélénium, à un certain nombre de difficultés. Le sélénium absorbe à $1960 \text{ \AA}$, longueur d'onde où un grand nombre de gaz, dont l'oxygène, présentent de larges bandes d'absorption.

Il faut éviter la présence d'air, donc travailler, dans la mesure où cela est possible, sous vide ou sous courant d'azote. Selon CHAMBERS (66), la sensibilité est multipliée par 2,54 lorsqu'on passe d'une flamme acétylène-air à une flamme hydrogène-azote.

Plusieurs combustibles ont été étudiés :

- air-acétylène (65), propane-butane-air (24), propane-air (325). La sensibilité est faible et le bruit de fond est important ;
- hydrogène-argon (200), hydrogène-azote (66). Ces flammes présentent une meilleure transparence dans la zone située au-dessous de 200 nm et une meilleure stabilité puisque le nombre de fluctuations au niveau du signal est faible ;
- KIRKBRIGHT et RANSON (209) ont utilisé la flamme acétylène-oxyde d'azote (NO_2) pour doser le sélénium en présence d'arsenic. Le dosage est hautement spécifique et le nombre d'éléments qui interfèrent est beaucoup moins important que dans la flamme argon-hydrogène.

11.4.8.1.3. - EXTRACTION PAR LES SOLVANTS ORGANIQUES :

Un nombre important d'agents chélateurs et de solvants organiques ont été utilisés en absorption atomique en vue d'augmenter la sensibilité, et ceci en modifiant le processus d'aspiration et de combustion, et/ou en réalisant une préconcentration de l'élément à doser.

Parmi ces dérivés, il existe le dibutyl-thio-phosphate (206), le sulfure de di-n-butyl dans le benzène (24) et le diéthyl dithio-carbamate dans l'isobutyl-méthyl-cétone (65).

CHAMBERS (66) a utilisé, en 1976, deux agents : le diéthyl dithio-carbamate de sodium (DEDC) et la pyrrolidine dithio-carbamate d'ammonium (APDC), et comme solvant il a choisi le tétrachlorure de carbone. La méthode est moins sensible que dans le cas d'une atomisation directe de la solution aqueuse car le solvant absorbe à la longueur d'onde choisie. Par suite, une réextraction a été envisagée. Cette réextraction est difficile à réaliser parce que les complexes présentent une stabilité remarquablement élevée, et la quantité de sélénium qui passait dans la phase aqueuse ne représente que le 1/5 du total dans le cas du DEDC. Pour remédier à cet inconvénient, la réextraction a été réalisée en présence d'argent ou de mercure présents à une concentration élevée, ce qui a posé le problème d'interférence à partir de ces éléments. Dans le cas d'ADPC, la réextraction a été faite en présence de cyanures à 50 ppm.

La méthode est cependant sensible. Ceci est dû à l'usage d'une flamme argon-hydrogène et à une préconcentration préalable (L.D. = 2 ppb).

11.4.8.1.4. - DOSAGE DU SELENIUM A L'ETAT D'HYDRURE :

L'introduction du sélénium à l'état d'hydrure (H_2Se) dans la flamme a permis d'augmenter de façon remarquable la sensibilité de la méthode et ses limites de détection (55, 354, 458).

La réduction du sélénium s'effectue de plusieurs manières :

- soit par le zinc et le chlorhydrate d'hydroxylamine en milieu chlorhydrique (458) ;
- soit par le borohydrure de sodium (208) ;
- soit, enfin, par le chlorure stanneux en présence de poudre de zinc (431) ou d'aluminium (138).

La flamme utilisée est toujours une flamme argon-hydrogène. Les limites de détection sont basses :

MILIEU	LIMITE DE DETECTION	REFERENCE
Eaux.....	1 µg/litre	KING (208)
Eaux.....	2 µg/litre	CALDWELL (55)
Milieus liquides...	0,05 ppm	YAMAMOTO (458)
Acier.....	1 ppm	FLEMING (116)
Fourrage.....	0,02 %	SAMUEL (350)
Milieus biologiques	10-20 ng/gramme (flamme $H_2 - N_2$)	FIORINO (115)

11.4.8.2. Absorption atomique sans flamme :

Les processus d'atomisation dans la flamme ont pratiquement atteint les limites de détection potentielle. Les possibilités sont déjà très bonnes et la méthode est convenable dans la majeure partie des cas.

Mais lorsqu'il s'agit de quantités d'échantillons extrêmement faibles dans lesquels on doit doser des traces de sélénium, on est gêné par l'introduction de ces petites quantités ou par l'utilisation de solvants qui peuvent être la cause d'introduction de certaines perturbations.

L'absorption atomique sans flamme a été largement appliquée au dosage du sélénium ces dernières années. Le tableau suivant (p. 152) résume les travaux réalisés dans ce domaine.

11.4.8.2.1. - INTERFERENCES :

Il s'agit d'absorption moléculaire et d'absorption à partir de sels inorganiques entre 180 et 220 nm. Ce phénomène a été étudié en détail par BAIRD (23). Les interférences proviennent du chlorure de potassium et du chlorure de sodium qui absorbent respectivement à 196 et 198,1 nm.

PIERCE et BROWN (314) ont revu en détail les interférences avec les cations et les anions divers présents à différentes concentrations.

L'acide perchlorique provenant d'une digestion nitro-perchlorique diminue de 25 % la hauteur du pic d'absorption. L'addition d'acide nitrique supprime en majeure partie cet effet.

EARL (106) a rapporté la formation, au cours du dosage, de sélénures réfractaires (nitrate - phosphate - chromate et sulfate) et a proposé l'addition de molybdène pour remédier à ceci. Le même auteur préconise le passage sur résine échangeuse d'ions pour les cations qui interfèrent.

IHNAT (190) préfère séparer le sélénium par réduction et précipitation à l'état de sélénium métalloïde. L'agent réducteur est l'acide ascorbique.

11.4.8.2.2. - AVANTAGES ET INCONVENIENTS :

- AVANTAGES :

- très bonne sensibilité ;
- limite de détection très basse ;
- méthode s'appliquant au dosage du sélénium à l'état de traces.

MILIEU	APPAREILLAGE	PRETRAITEMENT DE L'ECHANTILLON	MODE D'INTRODUCTION
EAUX NATURELLES	Atomiseur à tube de quartz 10 cm de longueur Chauffé à 850°C	Oxydation par le persulfate $K_2S_2O_8$	SeH_2 ($SnCl_2 + HCl + Al$)
-	HGA 2000, atomiseur à four de graphite, à programmation de température	1 g + 30 ml du mélange HNO_3 , HF, H_2O (1:1:1) Minéralisation. Réduire à 5 ml. Ajouter 20 ml d'eau. Chauffer.	directe
EAUX EFFLUENTS INDUSTRIELS	Atomiseur à four de graphite à programma- tion de température	Minéralisation, puis passage sur résine échangeuse d'ions IR 124	directe
REJETS INDUSTRIELS ET DOMESTIQUES	Techtron 63 à tube de carbone	Minéralisation ($HNO_3 + HClO_4$)	directe
MILIEUX BIOLOGIQUES	Techtron 63 à tube de carbone	Minéralisation ($HNO_3 + HClO_4$)	directe
-	Microtube en métal comme atomiseur 2000°C	Extraction avec la 3-3' diamino-benzidine	directe
	Atomiseur en tube de quartz non chauffé		SeH_2 ($NaBH_4$ à 1 %) + O_2
PETROLE ET DERIVES	Four Vycor chauffé avec une flamme H_2 -air-argon	Minéralisation ($H_2SO_4 - HNO_3$) $HClO_4$	SeH_2 ($SnCl_2 - HCl$) Zinc

GAZ D'ENTRAÎNEMENT	LIMITE DE DETECTION	SENSIBILITE	REMARQUES	REFERENCE
Argon + air	0,1 µg/litre		Les nitrates interfèrent	GOULDEN (138)
Argon	0,1 ppm		La sensibilité augmente avec la température d'atomi- sation. T optimale = 2400° C	WELCHER (441)
Azote	1 µg/litre		Le passage sur la résine permet d'éliminer les interférences. T optimale = 2500° C	EARL (106)
Azote	33 pg	32 pg	-	BAIRD (23)
-	$3 \cdot 10^{-10}$ g	$4 \cdot 10^{-10}$ g	Séparation par réduction et préci- pitation avec l'acide ascorbique	INHAT (190)
		$2,7 - 5,4 \cdot 10^{-11}$ g		OHTA (291)
		$6 \cdot 10^{-10}$ g S = 5-8 %	Comparaison de la méthode avec diffé- rentes autres techniques	SIEMER (390)
	10 ng/g	S = 8-30 ng/g		WALKER (431)

- INCONVENIENTS :

- la précision est moins bonne que la précédente (20 %), mais on a des concentrations de 10^{-10} à 10^{-11} g/prise d'essai, et elle peut être considérée comme suffisante ;
- le phénomène d'interférences pose un sérieux problème, d'où la nécessité de minéraliser l'eau, même lorsqu'il s'agit de très faibles teneurs en matières organiques. Il ne faut pas oublier les interférences provenant du mélange de minéralisation ;
- le rendement est médiocre. En moyenne, il est de 88 %. Il n'est que de 70 % pour une teneur de 0,2 µg/ml en sélénium (sélénium métalloïde).

11.4.9. - Spectrométrie de fluorescence X :

Le sélénium présente une raie $K\alpha$ de 1,106 Å. Cette raie est voisine de celle de l'arsenic et celle du brome (1,177 et 1,041 Å, respectivement), d'où la possibilité d'interférences. HANDLEY (159) a remédié à cet effet en utilisant un cristal de fluorure de lithium ($2d = 4,0269$ Å). Pour éliminer les erreurs provenant des effets de matrice, HANDLEY a utilisé la méthode de correction utilisant les radiations primaires diffusées (fond continu diffusé). Comme détecteur, il utilise un compteur à scintillation.

Cette méthode lui a permis de doser le sélénium dans les plantes sélénifères, le domaine d'application est de 0 à 300 ppm. FULLER (123) a ainsi dosé le sélénium dans les tissus animaux, utilisant la même méthode. De la même manière, OLSEN et SHELL (295) ont dosé le sélénium dans les dérivés organiques, le domaine d'application varie de 0 à 35 ppm.

Pour éliminer les effets de matrice, ALBRIGHT (7) a préféré isoler le sélénium en le précipitant à l'état de sélénium élémentaire.

En 1975, PRADZYNSKI (323) a appliqué la technique de fluorescence X "dispersive en énergie" au dosage du sélénium dans les échantillons d'eaux douces. Le domaine d'application de cette méthode s'étend de 0,6 à 50 ppb. Le sélénium peut être dosé en présence de métaux de transition. La pré-concentration est réalisée par emploi de pyrrolidine dithiocarbamate d'ammonium.

11.4.10. - Dosage radioactif du sélénium :

11.4.10.1. Méthodes utilisant des réactions nucléaires :
Analyse par radioactivation :

Bien que l'analyse par radioactivation soit une méthode extrêmement sensible et très spécifique, son application au dosage du sélénium dans les milieux biologiques n'est que relativement peu développée et peu utilisée.

L'activation peut s'effectuer soit par des neutrons thermiques, soit par des particules lourdes chargées telles que les protons p.

11.4.10.1.1. - NEUTRONS THERMIQUES :

L'activation la plus courante est celle qui est effectuée par les neutrons thermiques (0,025 ev) parce que la capture d'un électron thermique qui provoque des réactions de type (n - γ) est la plus simple en général et a la plus grande section efficace. Comme l'ont montré BOWEN et CAWSE en 1963 (38), il existe uniquement trois radiosotopes produits par le bombardement par des neutrons thermiques et pouvant être utilisés dans un but analytique. Les caractéristiques de ces différents isotopes sont énumérées dans le tableau suivant :

RADIO-ISOTOPE	ACTIVITE DU SELENIUM APRES IRRADIATION POUR UNE DUREE EGALE A LA DEMI-VIE (mC/g)	DEMI-VIE	ENERGIE DES PARTICULES β en Mev	ENERGIE DES PARTICULES γ en Mev
Se 75	25	120 jours	-	0,27 ; 0,14
Se 77 m	97	17,5 secondes	-	0,16
Se 81	25	18,6 minutes	1,60	-
-Autres :				
Se 79 m	2,9	3,9 minutes	-	0,096
Se 81 m	1,5	57 minutes	-	0,103
Se 83 m	0,46	69 secondes	3,40	1,01 ; 2,02
Se 83	0,04	25 minutes	1,70	0,36 ; 2,34

- SELENIUM 75 :

La plupart des méthodes par radioactivation neutronique reposent sur l'utilisation du radioisotope Se 75 (38, 437). Ce dernier présente deux pics photo-électriques de 0,27 et 0,14 Mev qui conviennent bien au dosage, et a l'avantage d'une durée de demi-vie longue permettant de réaliser une séparation chimique complète du reste des éléments radioactifs capables d'interférer. Mais il présente l'inconvénient d'une très longue durée d'activation qui est théoriquement le double de sa demi-vie. La plupart des analystes utilisent des périodes d'irradiation allant de 7 à 14 jours, ce qui fait diminuer énormément la sensibilité de la méthode puisque l'activité spécifique ne représente alors que 5 à 10 % de l'activité totale exprimée dans le tableau. A côté de ceci, il faut noter la présence d'interférences, notamment du phosphore 32, du mercure 197 m et 203, amenant la limite de détection à 10^{-6} g. Cette limite de détection est insuffisante pour permettre la détection et le dosage des traces dans les milieux biologiques. GRANT (142) a réussi à améliorer la sensibilité et la limite de détection (10^{-8} g) en réalisant une séparation chimique de l'élément par distillation en présence d'acide bromhydrique.

- SELENIUM 77 m (221) :

Il présente une période de demi-vie très courte : 17,5 secondes, ce qui signifie que seules les méthodes par spectrométrie gamma automatique peuvent être utilisées dans le but d'améliorer et d'augmenter la fidélité et la reproductibilité de la méthode, qui sont liées étroitement au temps nécessaire pour le transfert des échantillons du réacteur nucléaire au détecteur proprement dit. Le comptage s'effectue à 0,16 Mev. L'avantage sur la méthode précédente est sa rapidité, elle ne nécessite pas une séparation radiochimique. Cependant, sa détection est limitée à 3 µg/prise d'essai, ceci est dû au fait que 90 % de l'énergie γ subit une conversion interne. D'autres inconvénients viennent s'ajouter à ceci, notamment le grand nombre d'éléments qui interfèrent : N 16, Na 24, Ne 23, F 20, Cl 38, O 19 et N 13. L'utilisation d'un cristal d'iodure de sodium très fin permet d'éliminer l'effet de rétrodiffusion. Une déshydratation préalable baissant la teneur en oxygène permet d'améliorer la sensibilité.

- SELENIUM 81 :

Le sélénium 81 est un émetteur β . Sa période de demi-vie est de 18 minutes. Il présente deux avantages :

- une sensibilité élevée égale à celle obtenue avec le sélénium 75 ;
- une durée d'irradiation courte.

La méthode utilisant le sélénium 81 a été décrite par BOWEN et CAWSE (38). Elle repose sur une irradiation de l'échantillon, suivie d'une séparation radiochimique. La quantité minimum détectable est de $5 \cdot 10^{-9}$ g, la séparation est effectuée par distillation permettant d'éliminer l'arsenic, le manganèse, le sodium et le zinc.

Cette méthode est cependant délicate car les différentes étapes de séparation nécessitent un temps nettement supérieur à 30 minutes ; les interférences majeures proviennent du $\text{Br } 81 \text{ (n - p)} \rightarrow \text{Se } 81$, $\text{Kr } 84 \text{ (n - } \alpha \text{)} \rightarrow \text{Se } 81$ et $\text{U } 235 \text{ (n - F)} \rightarrow \text{Se } 81$.

A cause de l'interférence avec le brome, BETTERIDGE (29) a réalisé la séparation par extraction avec la diamino-3,3' benzidine.

- AUTRES RADIOISOTOPES :

Les autres radioisotopes qui ont été proposés pour le dosage du sélénium par activation neutronique sont :

- Se 79 m $D \frac{1}{2} = 3,9 \text{ mn}$
- Se 81 m $D \frac{1}{2} = 57 \text{ mn (457)}$

Ils nécessitent une séparation radiochimique ultrarapide. Ils sont rarement utilisés.

11.4.10.1.2. - PARTICULES CHARGÉES : PROTONS :

Une autre méthode d'activation consiste à irradier le sélénium par des particules lourdes chargées telles que les protons. Les protons utilisés ont une énergie de 10,04 Mev, la durée d'irradiation est de 1 heure (89).

Le choix de la valeur énergétique des protons est d'une importance considérable. A 10 Mev, l'irradiation est hautement spécifique, on est en présence de réactions de type $(p - n)$, alors que les réactions de type $(p - \alpha)$, $(p - 2n)$, $(p - d)$ et $(p - pn)$, bien que possibles du point de vue énergétique, ne présentent cependant qu'une section efficace très faible. Ceci a permis de réduire les interférences à partir d'éléments de numéro atomique $z + 2$ et $z + 1$. La quantité minimum détectable est de 10 ppb, l'erreur relative est de 10 à 15 %.

11.4.10.1.3. - DISCUSSION :

- AVANTAGES :

- Méthode rapide pour la plupart des radioisotopes, sauf le Se 75.
- On peut effectuer une analyse non destructive de l'échantillon, de façon à identifier le spectre. Il est possible d'identifier d'autres éléments en connaissant les caractéristiques des réactions nucléaires et celles des isotopes.

- Il faut insister sur un caractère particulier par rapport aux autres méthodes : l'activation est indépendante de la forme chimique sous laquelle se trouve l'élément dans l'échantillon.

- INCONVENIENTS :

- Elle nécessite un appareillage cher et un personnel spécialisé : réacteur nucléaire en cas de neutrons thermiques, cyclotron en cas de protons. Ceci n'est pas à la portée de tous les laboratoires.
- Dans la majorité des cas, elle nécessite une séparation radiochimique qui doit être réalisée rapidement.
- La précision et la spécificité dépendent de la pureté du flux de particules d'activation.
- La sensibilité n'est pas aussi bonne que pour le reste des éléments.

11.4.10.2. Méthodes utilisant des radionuclides :
Dilution isotopique :

Une technique basée sur l'utilisation d'un traceur radioisotopique a été décrite par KELLEHER et JOHNSON (204). Le domaine d'application s'étend de 0,015 ppm à 1,0 ppm.

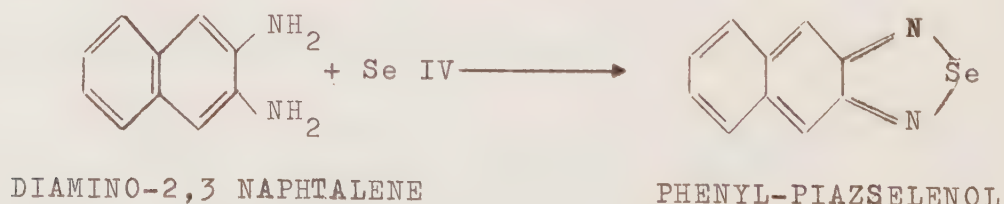
11.4.11. - Dosages chromatographiques :

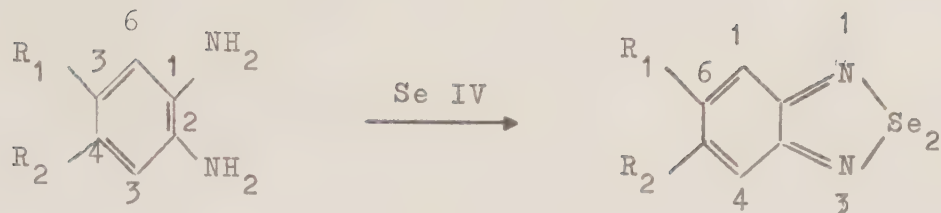
11.4.11.1. Chromatographie en phase gazeuse :

11.4.11.1.1. - DERIVES DE L'ORTHO-PHENYLENE-DIAMINE :

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse repose sur la formation d'un complexe entre le sélénium (IV) et une orthophénylène diamine en milieu acide, suivie de l'extraction du complexe ainsi formé par un solvant organique approprié, le toluène étant le plus souvent utilisé.

Les orthophénylène diamines sont généralement mono ou disubstituées, possédant un ou deux groupements électrophores permettant d'augmenter aussi bien la sensibilité que la spécificité à la suite de l'usage d'un détecteur à capture d'électrons. Les principaux dérivés utilisés sont les suivants :





DIAMINO-1,2 BENZENE $\longrightarrow$ PIAZSELENOL



DIAMINO-1,2-
DICHLORO-4,5-BENZENE $\longrightarrow$ DICHLORO-5,6-PIAZSELENOL



DIAMINO-1,2-
NITRO-4-BENZENE $\longrightarrow$ NITRO-5-PIAZSELENOL



DIAMINO-1,2-
CHLORO-4-BENZENE $\longrightarrow$ CHLORO-5-PIAZSELENOL

Le tableau suivant (p. 160) résume les principaux travaux effectués dans ce domaine.

11.4.11.1.2. - ACETOPHENONE :

IORANOV (191) a utilisé, comme réactif complexant du sélénium, l'acétophénone. L'extraction du complexe s'effectue par le benzène et l'analyse chromatographique s'effectue sur une colonne d'alumine. Le détecteur est un détecteur à capture d'électrons. La sensibilité n'est pas aussi grande que celle des méthodes précédentes. La reproductibilité est médiocre puisque, pour une teneur de 5 μg en sélénium, l'erreur relative est déjà de 6 %.

11.4.11.1.3. - DERIVE TRIMETHYL SILYLE :

Le sélénium peut être aussi analysé sous forme d'un dérivé triméthyl silylé (44). Le dérivé se forme par passage du sel d'ammonium de l'acide sélénieux sur une colonne échangeuse d'ions. Le produit identifié par spectrométrie semble être le $SeO_2 (Me_3Si)_2$.

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

(DERIVES DE L'ORTHO-PHENYLENE DIAMINE)

DERIVE	SPECTRE UV-V/TOLUENE		COLONNE	PHASE STATIONNAIRE	GAZ VECTEUR DEBIT
	λ MAX.	ϵ MAX.			
PIAZSELENOL	335	$1,5 \cdot 10^4$	1.5 ft x 0.25" en verre	OV 225 sur du Supasorb (AW HMDS) 100-120 mesh	Azote 35 ml/mn
PIAZSELENOL	379	$1,97 \cdot 10^4$	6 ft x 1/2" en acier	3 % SE 30 sur Chromosorb G 60-80 mesh	Helium 40 ml/mn
			1.5 ft x 0.25" en verre	OV 225 sur du Supasorb (AW HMDS) 100-120 mesh	Azote 35 ml/mn
CHLORO, 5 PIAZSELENOL	-	-	2 m x 4 mm en verre	15 % SE 30 sur Chromosorb W 60 à 80 mesh	Azote 50 ml/mn
			1 m x 3 mm en verre	15 % SE 30 sur Chromosorb W 60 à 80 mesh	Helium 20 ml/mn
DICHLORO-5,6 PIAZSELENOL	349	$2,1 \cdot 10^4$	1,5 m x 3 mm en verre Pyrex	1,5 % OV 17 + 1,95 % QF 1 sur Chromosorb WHP 100-120 mesh	Argon + méthane (95 : 5 V : V) 40 ml/mn
			1,5 m x 3 mm en verre Pyrex	2 % DEGS + 0,5 % H_3PO_4 sur Chromosorb WHP 100-120 mesh	Azote 35 ml/mn
			1.5 ft x 0.25" en verre	OV 225 sur du Supasorb (AW HMDS) 100-120 mesh	Azote 35 ml/mn
NITRO-5 PIAZSELENOL	349	$1,57 \cdot 10^4$	1.5 ft x 0.25" en verre	OV 225 sur du Supasorb (AW HMDS) 100-120 mesh	Azote 35 ml/mn
			1 m x 4 mm en verre	15 % SE 30 sur Chromosorb W 60-80 mesh	Azote 27 ml/mn
			1 m x 3 mm en verre	15 % SE 30 sur Chromosorb W 60-80 mesh	Azote 30 ml/mn

N. B. - ECD : Détecteur à capture d'électrons.

DCT : Détecteur à conductivité thermique.

Chromatographie en phase gazeuse (dérivés de l'ortho-phénylène diamine)

TEMPERATURE E LA CHAMBRE D'INJECTION	TEMPERATURE DE LA COLONNE	TEMPERATURE DU DETECTEUR	SOLVANT	TEMPS DE RETENTION	QUANTITE MINIMUM DETECTABLE	REFERENCE
-	180°C	350°C ECD	toluène	1,59 mn	90.10^{-12} g	POOLE (320)
250°C	165°C	300°C ECD	hexane	2,10 mn	5.10^{-10} g	YOUNG (459)
-	230°C	350°C ECD	toluène	4,69 mn	20.10^{-12} g	POOLE (320)
-	200°C	-	toluène	3 mn	4.10^{-8} g	NAKASHIMA (279)
-	200°C	200°C DCT	toluène	-	10^{-5} g	AKIBA (5)
250°C	200°C	275°C ECD	toluène	3 mn	100.10^{-12} g	STIJVE (406)
250°C	170°C	245°C ECD	toluène	2 mn	100.10^{-12} g	STIJVE (406)
-	220°C	350°C ECD	toluène	1,78 mn	20.10^{-12} g	POOLE (320)
-	220°C	350°C ECD	toluène	3,94 mn	10^{-12}	POOLE (320)
-	200°C	200°C ECD	toluène	3,50 mn	5.10^{-9} g	SHIMOISHI (384)
-	200°C	230°C ECD	toluène	-	2.10^{-8} g	AKIBA (6)

11.4.11.1.4. - DISCUSSION :

- INCONVENIENTS : les dérivés de l'orthophénylène diamine présentent les inconvénients suivants :

- Difficulté de préparation des réactifs.
- Présence d'impuretés dans les réactifs qu'il est impossible d'éliminer. La purification par recristallisation n'a pas abouti à des résultats satisfaisants (459). Ceci conduit à l'apparition de plusieurs pics dans le chromatogramme.
- Instabilité des solutions de réactifs.
- Les dérivés de l'orthophénylène diamine sont facilement oxydés par l'acide nitrique présent à l'état de traces et provenant de la minéralisation de l'échantillon. Il s'en suit l'apparition de nouveaux pics dans le chromatogramme. La seule méthode de minéralisation pouvant donner satisfaction est celle qui utilise un mélange d'acide nitrique - nitrate de magnésium. La minéralisation s'effectue à 80-90°C pendant 2 à 3 heures et est suivie d'une évaporation à sec, puis d'une calcination à 500°C au four à moufle (320). Ceci entraîne une baisse du rendement de la méthode.
- Les interférences des autres cations n'ont pas été étudiées ou mentionnées.

- AVANTAGES :

- Très bonne sensibilité. La limite de détection varie de 10^{-8} à 10^{-12} g.
- Bonne sélectivité de la méthode.

11.4.11.2. Chromatographie liquide à haute performance : (445)

Après complexation par le diamino-2,3 naphtalène, le sélénium peut être dosé :

- soit directement (sans extraction), par chromatographie de partage à polarité de phase inversée sur une colonne μ Bondapak C18. La phase mobile est un mélange eau-éthanol, le domaine d'application s'étend de 0,5 à 10 ppm ;
- soit indirectement, après extraction par le chloroforme et dilution de l'extrait avec de l'éthanol, par chromatographie de partage classique sur une colonne Durapak Carbowax 400. La phase mobile est le chloroforme, le domaine d'application s'étend de 10 à 100 ppb.

La détection dans les deux cas s'effectue soit en ultra-violet, soit par fluorimétrie.

11.4.12. - Dosages électro-chimiques :

11.4.12.1. Polarographie :

Une méthode de dosage du sélénium dans l'eau par polarographie classique a été mise au point par CERVENKA (64) en 1955. Après séparation du sélénium du reste des éléments par précipitation à l'état de sélénium élémentaire, le précipité est dissous dans un mélange de brome et d'acide bromhydrique dilué. L'excès de brome est éliminé par un courant d'anhydride carbonique, le polarogramme est tracé entre 400 et 650 mV. Comme électrode de référence, on utilise une électrode de tungstène saturée au calomel. La hauteur de la vague observée est proportionnelle à la concentration en sélénium. Le domaine d'application s'étend de 5 à 100 μg de sélénium par 10 ml. Une meilleure sensibilité est observée lorsque le mélange brome - acide bromhydrique est remplacé par l'acide chlorhydrique 2 N. Le tracé du polarogramme s'effectuera alors entre 300 et 650 mV.

La même année, DOLEZAL (96) a appliqué la polarographie classique au dosage du sélénium dans les pyrites. Après dissolution de l'échantillon dans un mélange brome - acide bromhydrique, le sélénium est séparé par distillation à l'état de tétrabromure de sélénium, réduit à l'état élémentaire, puis repris par un mélange acide nitrique - acide sulfurique. Après élimination de l'acide nitrique par distillation, la solution est neutralisée à $\text{pH} = 8$. A ce pH, le potentiel de demi-vague du sélénium est de -1,44 volts par rapport à une électrode de référence au calomel. La hauteur de la vague est proportionnelle à la concentration en sélénium. Le domaine d'application s'étend de $8 \cdot 10^{-6}$ M à $2,5 \cdot 10^{-3}$ M.

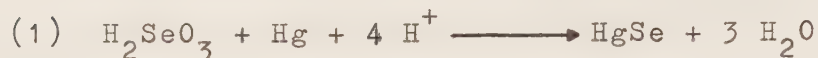
HAHN (152) a utilisé une méthode indirecte : après précipitation du sélénite à l'état de séléniure de thallium Tl_2Se à partir d'une solution ammoniacale par le nitrate de thallium en présence de sulfate d'hydrazine, l'excès de thallium est dosé par polarographie.

- AVANTAGES ET INCONVENIENTS :

Plusieurs observations ont été faites :

- Possibilité d'interférence d'un grand nombre d'éléments. Le cuivre, par exemple, peut donner un précipité de sélénite de cuivre, d'où la nécessité d'une séparation préalable soit par distillation (96), soit par précipitation, soit, enfin, par extraction avec la diamino-3,3' benzidine (71).
- En milieu acide, il peut y avoir attaque du mercure qui se dissout et donne avec le sélénium un précipité de

sélénure de mercure, avec apparition d'une deuxième vague non réversible correspondant à la réaction 3 :



Cette réaction a lieu à un potentiel plus bas que la première.

- Sensibilité faible. La limite de détection n'est que de 0,2 µg/ml.

11.4.12.2. Voltamétrie par redissolution anodique :

En 1975, ANDREWS et JOHNSON (16) ont appliqué la voltamétrie par redissolution anodique au dosage du sélénium dans l'acide perchlorique 0,1 M. La sensibilité de la méthode est très bonne et la limite de détection est de 0,04 ppb environ.

En 1976, la méthode a été appliquée au dosage du sélénium dans les milieux biologiques : après séparation par passage sur résine échangeuse d'ions IRA 200, le dosage s'effectue par voltamétrie, par redissolution anodique à l'électrode tubulaire d'or. De très bons résultats sont observés, excepté en présence de SiO_2 . Le Bi III peut interférer, la limite de détection est de 4 ppb (0,6 ng dans un échantillon de 0,16 ml) (17).

11.4.12.3. Voltamétrie par redissolution cathodique :

Cette méthode est aussi très récente, elle date de 1976 (448). Le sélénium est dosé après sa réduction en Se^{2-} par le borohydrure de sodium et acidification pour le dégagement de l'hydruure de sélénium piégé dans une solution alcaline. La limite de détection est de 1 ppb.

11.4.12.4. Autres :

Une méthode coulométrique (306) et une méthode ampérométrique (38) ont été proposées. Le dosage se heurte à plusieurs difficultés : interférences, d'où nécessité de séparation préalable, et mauvaise sensibilité.

T R A V A U X P E R S O N N E L S

1. DOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE DANS LE VISIBLE

REVUE DE QUELQUES METHODES D'ANALYSE DU SELENIUM

1.1. METHODE UTILISANT LE MELANGE DE MINERALISATION SULFO-NITRO-PERCHLORIQUE -

1.1.1. - Introduction :

A la suite d'une demande de recherche du sélénium dans les urines de personnes supposées intoxiquées par ce métalloïde, nous avons appliqué une méthode qui nous semble simple et que nous décrivons ci-dessous.

1.1.2. - Description de la méthode :

Prélever 25 ml d'urine et faire évaporer à sec à l'étuve maintenue à une température constante de 100°C, dans un erlen de 100 ml à col rodé, après avoir amené l'urine à un pH voisin de 8 par addition d'un millilitre environ de lessive de soude.

Retirer de l'étuve. Vérifier que le résidu est bien sec et laisser refroidir.

Ajouter au résidu sec, successivement :

- 2 ml d'acide sulfurique pur (95 %),
- 2 ml d'acide perchlorique à 70 %,
- et 2 ml d'acide nitrique concentré à 65 %.

Laisser refroidir le contenu de l'erlen à la suite de chaque addition d'acide.

Adapter l'erlen à un réfrigérant ascendant et chauffer à feu doux sur un bec de gaz pendant 35 minutes.

Laisser refroidir le mélange, puis rincer le réfrigérant avec 10 ml d'ammoniaque concentrée.

Retirer le réfrigérant. Continuer d'ajouter de l'ammoniaque pour amener le mélange à pH = 2. Si ce pH est dépassé, réajuster avec de l'acide chlorhydrique concentré.

Ajouter successivement :

- 1,5 g de chlorhydrate d'hydroxylamine poudre ou 4 ml d'une solution à 40 % dans l'eau distillée,
- 300 mg de titriplex III : sel disodique de l'acide éthylène diamine tétracétique,
- de l'acide formique concentré, goutte à goutte, en quantité suffisante pour que le pH final soit compris entre 1,6 et 1,8,
- 1 ml de solution à 1 % de chlorhydrate de diamino-3,3' benzidine dans l'eau distillée.

Placer au bain-marie bouillant pendant 5 minutes.

Retirer ; laisser refroidir, puis amener le pH à une valeur voisine de 8 (8 ± 1) avec de l'ammoniaque concentré.

Ajuster tous les erlens au même volume. Vérifier le pH, puis extraire le complexe coloré formé entre le sélénium et la diamino-3,3' benzidine avec du toluène. Le rapport du volume du toluène sur le volume de la phase aqueuse doit être égal à 1/5.

Agiter énergiquement les erlens pendant une minute et laisser séparer les deux phases organique et aqueuse dans une ampoule à décanner.

Spectrophotométrer la phase organique et mesurer l'absorption à 420 nm.

Parallèlement au dosage et en respectant les mêmes conditions de volume, préparer une série d'étalons renfermant respectivement 0, 2, 4 et 6 μg de sélénium. Procéder de la même façon que pour le dosage à partir de "continuer d'ajouter de l'ammoniaque pour amener le mélange à pH = 2".

1.1.3. - Réactifs et matériel :

1.1.3.1. Réactifs :

- Sélénite de sodium Na_2SeO_3 , 5 H_2O pour analyse, min. 99 %, MERCK - P.M. = 263 g.

Préparer une solution mère à 1 mg de sélénium par ml. Pour cela, peser avec précision 3,3291 g de sélénite de sodium hydraté : Na_2SeO_3 , 5 H_2O , et faire dissoudre dans un litre de solution d'acide chlorhydrique à 1 % dans l'eau distillée (environ 0,1 N).

A partir de cette solution mère, faire une dilution au 1/500 correspondant à 2 μg par ml. La dilution s'effectue toujours à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique à 1 %.

- Acide sulfurique min. 95 % pour analyse MERCK.
- Acide nitrique min. 65 % pour analyse et chromatographie MERCK.
- Acide perchlorique 70 % pour analyse MERCK.
- Acide chlorhydrique min. 37 % pour analyse MERCK.
- Ammoniaque - d = 0,92 - normapur, pour analyse PROLABO.
- Acide formique 98-100 % pour analyse MERCK.
- Chlorhydrate d'hydroxylamine pour analyse, normapur, PROLABO.
- EDTA titriplex III pour analyse min. 99 %, MERCK, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$, 2 H_2O - P.M. = 372,24 g.
- Chlorhydrate de diamino-3,3' benzidine anhydre SIGMA - P.M. = 360,1.

Préparer une solution extemporanée à 1 % dans l'eau distillée.

- Toluène pour analyse PROLABO.

1.1.3.2. Matériel et appareillage :

- Spectrophotomètre BECKMAN, modèle DB-GT, à double faisceau et muni de cuves de 4 cm d'épaisseur. L'absorbance est mesurée sur l'échelle E_1 permettant de multiplier la valeur lue sur le cadran du galvanomètre par 2.
- pH-mètre PHILIPS PW 9408, une électrode de pH en verre PHILIPS munie d'une électrode de référence interne Ag/AgCl et deux solutions tampons : l'une à pH = 7,00 (mélange de phosphate disodique et phosphate acide de potassium) et l'autre à pH = 4,00 (phtalate acide de potassium).
- Etuve, balance de précision.
- Pipettes, bécher, fioles jaugées, erlens de 100 ml à col rodé et réfrigérants ascendants.

1.1.4. - Explications :

L'évaporation de l'urine à sec à l'étuve permet, lors de l'addition du mélange de minéralisation, d'éviter la dilution et de conserver par conséquent le pouvoir oxydant et minéralisant du mélange d'acides, réalisant ainsi une meilleure destruction de la matière organique. Elle permet, en outre, d'utiliser un volume important de prise d'essai d'urine.

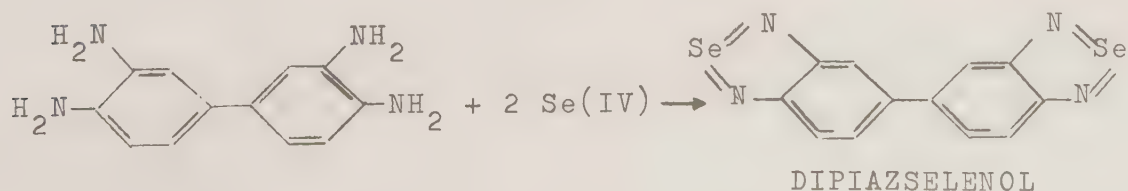
L'alcalinisation des urines par addition de la lessive de soude permet de transformer certains dérivés volatils en sels sodiques stables.

Le chlorhydrate d'hydroxylamine permet, en tant qu'agent réducteur, d'éviter l'oxydation de la diamino-benzidine en solution.

L'EDTA est un chélateur. Il permet de complexer le fer, le calcium et d'autres cations qui interfèrent avec le sélénium.

L'acide formique a un pouvoir tampon maximal à pH = 3,7 ($K = 1,7 \cdot 10^{-4}$). L'addition au mélange permet de freiner la brusque variation du pH dans la zone voisine de 2.

La diamino-3,3' benzidine donne avec le sélénium, dans les conditions opératoires décrites, un complexe coloré appelé dipiazsélénol dont la structure est la suivante :



Pour chaque concentration en sélénium, le dosage est réalisé en trois exemplaires (sauf pour le blanc réactif). Les tubes sont numérotés a, b et c.

Les résultats observés sont les suivants :

Tubes.....	0 (0 µg)	1 (2 µg)	2 (4 µg)	3 (6 µg)	4 (8 µg)	5 (10 µg)
a- Valeur lue....	0,023	0,215	0,368	0,539	0,720	0,810
a- Valeur corrigée	0,023	0,192	0,345	0,516	0,697	0,787
b- Valeur lue....	0,023	0,195	0,371	0,543	0,709	0,810
b- Valeur corrigée	0,023	0,172	0,348	0,520	0,686	0,787
c- Valeur lue....	-	0,189	0,367	0,551	0,713	0,816
c- Valeur corrigée	-	0,166	0,344	0,528	0,69	0,793
Moyenne lue.....	0,023	0,20	0,369	0,544	0,714	0,812
Moyenne corrigée.	0,023	0,177	0,346	0,521	0,691	0,789

N.B. : La lecture de l'absorbance a été faite sur l'échelle E_2 .

1.1.5.2. Conclusions :

1.1.5.2.1. - LINEARITE :

A partir de ces résultats, nous avons tracé la courbe Absorbance en fonction de la teneur en sélénium. Nous constatons que la loi de BEER est vérifiée pour des concentrations allant jusqu'à 8 µg dans la prise d'essai, et ceci dans les conditions opératoires décrites ci-dessus.

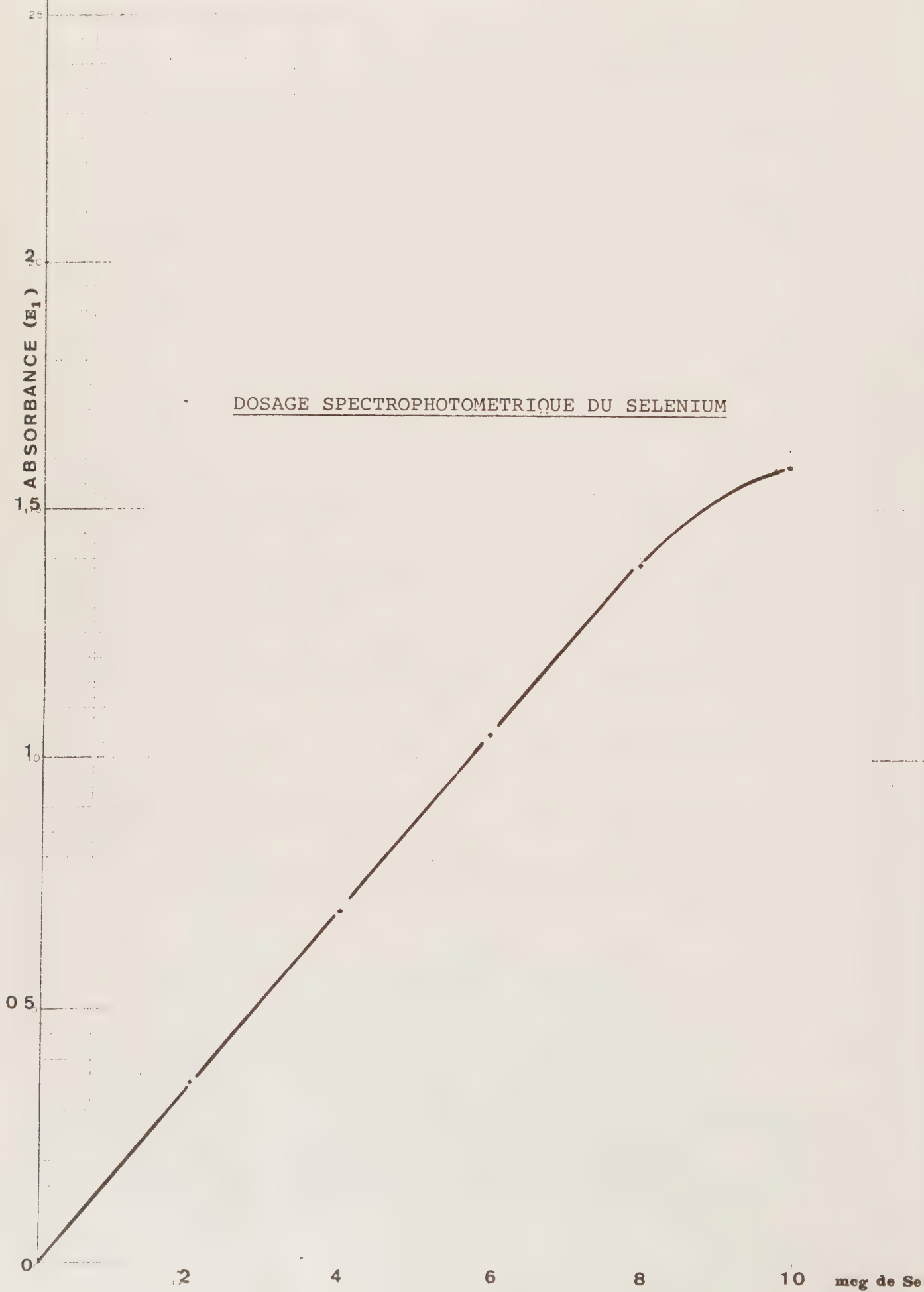
1.1.5.2.2. - SENSIBILITE :

La méthode de régression linéaire donne pour la droite une équation de la forme $y = a x + b$

où $a = 0,086$ et $b = 1,6.10^{-3}$

D'où : $y = 0,086 x + 1,6.10^{-3}$, et en négligeant le deuxième terme devant a, l'équation sera : $y = 0,086 x$ et la droite passe par l'origine.

La sensibilité est donnée par la pente a. Ainsi, à 1 µg de sélénium, correspond une absorbance de 0,086 à l'échelle E_2 .



1.1.5.2.3. - REPRODUCTIBILITE :

D'après les résultats observés, la reproductibilité est bonne.

1.1.5.2.4. - LIMITE DE DETECTION :

La limite de détection est définie comme étant la valeur correspondant à 3 fois l'écart-type du blanc réactif pour un seuil de sécurité égale à 0,01.

Pour calculer l'écart-type avec précision, nous avons réalisé plusieurs blancs réactifs et nous avons mesuré l'absorbance correspondante à 420 nm. Les valeurs observées sont les suivantes :

Tube N°.....	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Absorbance lue.....	0,025	0,018	0,026	0,023	0,017	0,024	0,02	0,018	0,022
Cuves 4 cm E ₂									

$$M = 0,021 ; s = 0,0633$$

Limite de détection = $3 s = 0,00996$ ou $0,020$ sur E₁
ce qui correspond à $\frac{0,009}{0,0863} = 0,12 \mu\text{g}$ de sélénium.

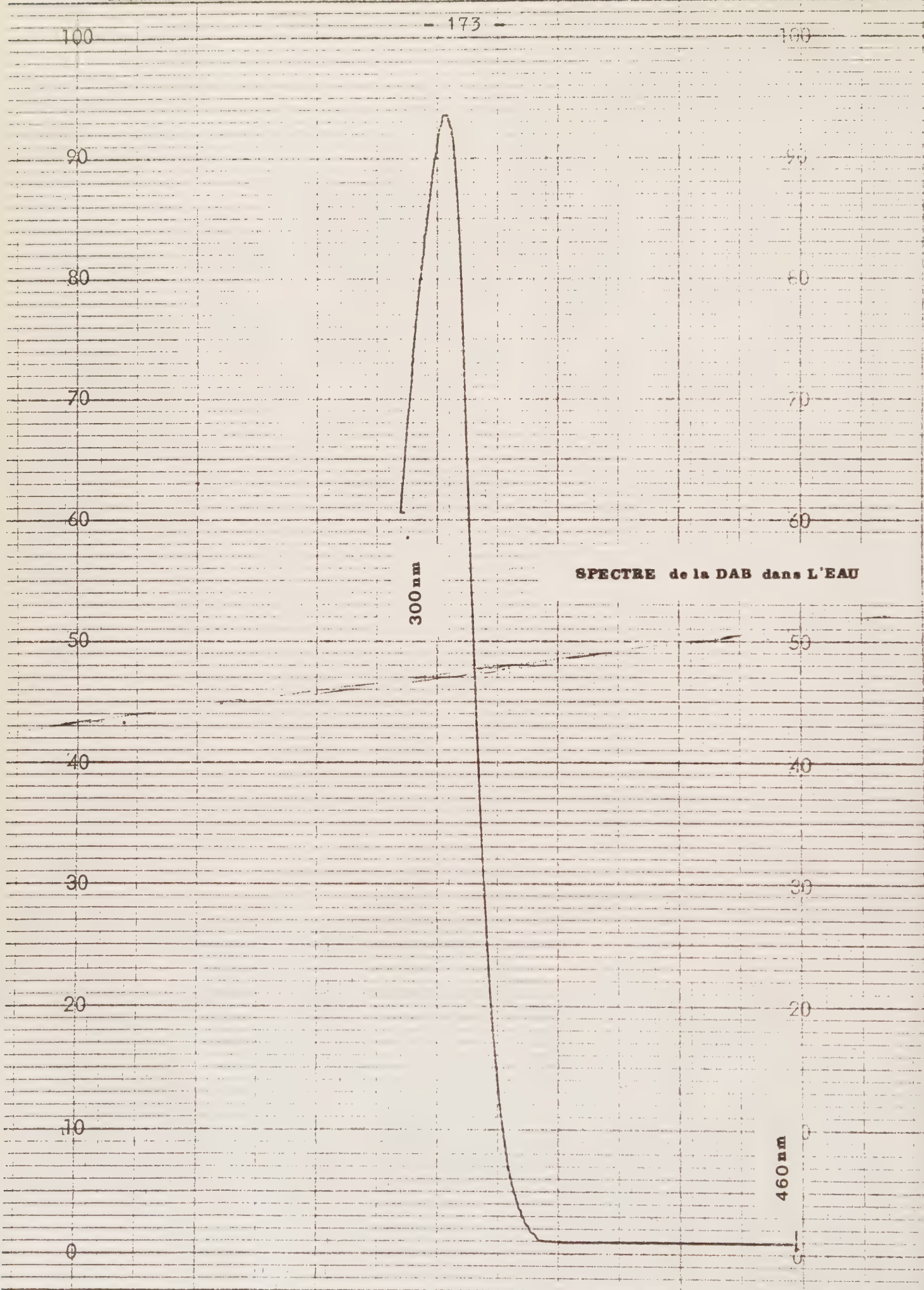
Cette limite de détection n'est que théorique puisque, comme nous allons le voir ultérieurement, à la moindre trace d'acide, les valeurs observées du blanc réactif et du dosage varient énormément.

1.1.5.3. Caractéristiques du spectre :

1.1.5.3.1. - TRACE DU SPECTRE DU CHLORHYDRATE DE
DIAMINO-3,3'BENZIDINE DANS L'EAU :
(p. 173)

Ce spectre correspond à une concentration de 250 mg/l de chlorhydrate de diamino-3,3' benzidine dans l'eau distillée. Le tracé s'effectue entre 300 et 460 nm, sur E₂. Les cuves ont 1 cm d'épaisseur. Le maximum d'absorption est observé à 315 nm, il s'agit de la bande B (Benzénoïde) correspondant à une transition $\pi \rightarrow \pi^*$ des spectres des molécules aromatiques. L'accroissement du nombre de systèmes conjugués les uns avec les autres provoque un accroissement de l'intensité de cette bande, ainsi que son déplacement vers les grandes longueurs d'onde. $\xi = 2,69.10^3$.

- 173 -



SPECTRE de la DAB dans L'EAU

300 nm

460 nm

1.1.5.3.2. - TRACE DU SPECTRE DU COMPLEXE
SELENIUM - DIAMINO-3,3'BENZIDINE
DANS LE TOLUENE : (p. 175)

Le spectre correspond à une prise d'essai de 2 µg de sélénium et un volume final de 20 ml extrait avec 4 ml de toluène. Le tracé s'effectue entre 480 nm et 330 nm. Deux maximums d'absorption sont observés : l'un à 420 nm et l'autre à 340 nm. La première bande à 420 nm correspond à une transition $n - \pi^*$ (bande R) $\bar{N} \rightleftharpoons Se$ et présente un ξ de : 8,12. La deuxième, située à 340 nm, est toujours la bande benzénoïde B correspondant à la transition $\pi - \pi^*$ des deux cycles aromatiques.

1.1.5.4. Dosage proprement dit :

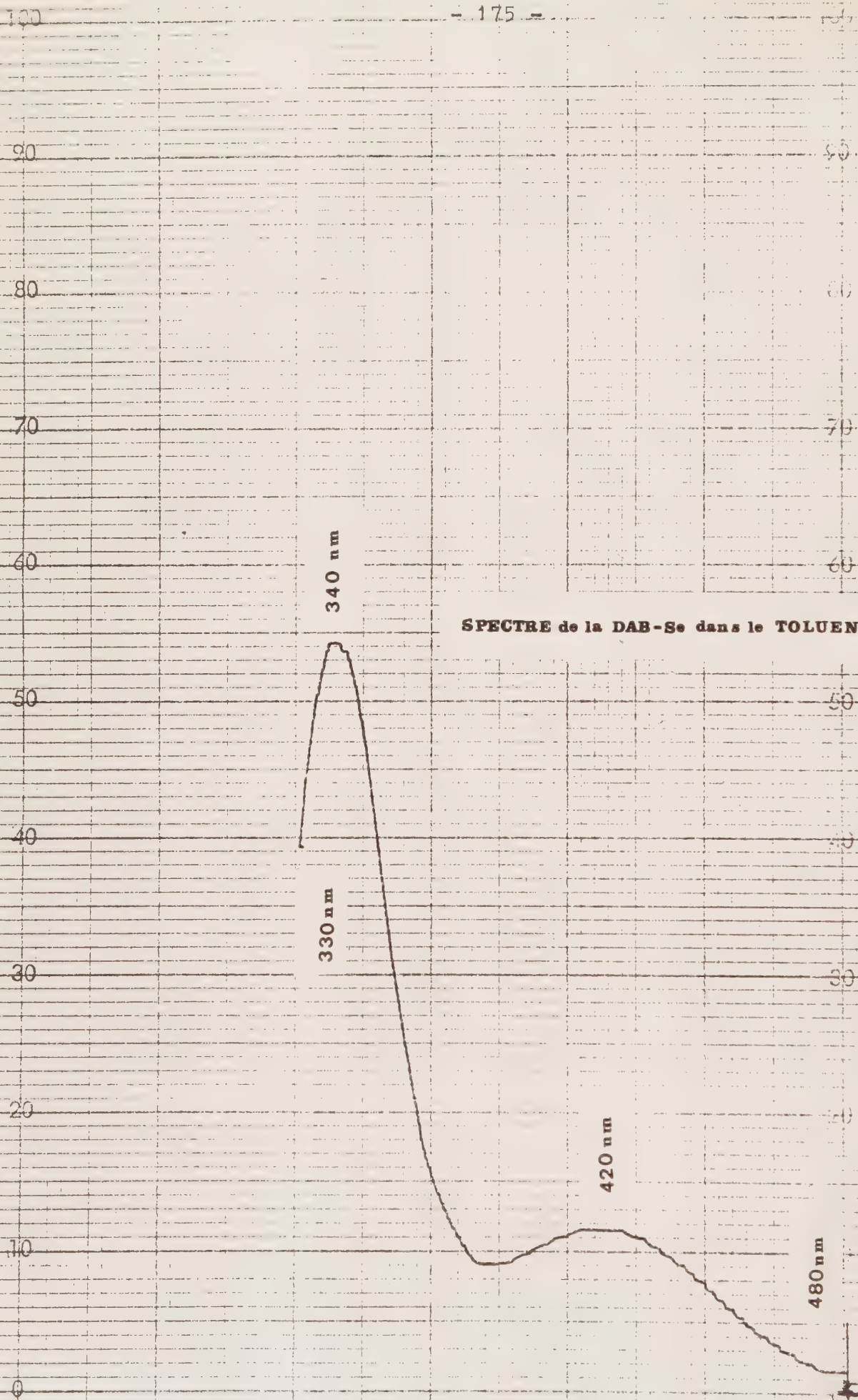
Nous envisageons de déterminer les teneurs en sélénium dans l'urine provenant d'un sujet normal non exposé au sélénium ou à l'un de ses dérivés. Le dosage s'effectue selon la méthode proposée avec, pour unique modification, l'utilisation de la méthode des ajouts. L'avantage de cette dernière est de faire subir aux témoins les mêmes conditions opératoires que le dosage proprement dit.

Pour les 6 échantillons d'urine, dont 3 ont été additionnés chacun de 2 ml de solution de sélénite de sodium à 2 µg/ml dans l'acide chlorhydrique à 1 %, les résultats observés sont les suivants :

DOSAGE N°	PRISE D'ESSAI D'URINE	SOLUTION DE SELENITE DE SODIUM à 2 µg/ml dans HCl à 1%	ABSORBANCE à 420 nm (cuves de 4 cm, E ₂)	
1	25	0 ml	0,420	} M = 0,362
2	25	0 ml	0,300	
3	25	0 ml	0,367	
4	25	2 ml	0,610	} M = 0,623
5	25	2 ml	0,560	
6	25	2 ml	0,700	

- 175 -

SPECTRE de la DAB-Se dans le TOLUENE



- DISCUSSION :

- Les pertes :

A 4 μg de sélénium, correspond une absorbance de :
 $0,623 - 0,362 = 0,261$. L'absorbance relative à 1 μg de sélénium sera de 0,0653.

Or, lors de la préparation de la gamme étalon, nous avons trouvé qu'à 1 μg de sélénium, correspond une absorbance de 0,086. En se basant sur ces chiffres, le rendement ne dépasserait guère 76 %. La perte au cours du dosage serait donc importante.

- La non-reproductibilité :

Elle est très nette. L'observation d'écarts importants entre les différentes valeurs le confirme.

- La non-spécificité :

L'absence d'un maximum d'absorption, lors du tracé du spectre de la phase organique correspondant au dosage, suggère la production d'une coloration parasite et non spécifique s'ajoutant à la coloration caractéristique du complexe sélénium - diamino-3,3' benzidine et interférant avec lui dans la zone relative d'absorption.

- Teneur de l'urine en sélénium :

$$\begin{array}{l} 0,0653 \longrightarrow 1 \mu\text{g} \\ 0,362 \longrightarrow x \mu\text{g} \end{array}$$

d'où la quantité de sélénium présente dans 25 ml d'unité est de : $\frac{0,362}{0,0653} = 5,544 \mu\text{g}$.

Ceci correspond à 221,75 μg de sélénium par litre d'urine.

Cette valeur nous semble être très élevée par comparaison avec la teneur moyenne observée aux Etats-Unis.

Cette observation confirme la formation de la coloration non spécifique extraite par la phase organique et absorbant à 420 nm.

1.2. METHODE UTILISANT LE MELANGE SULFO-PERCHLORIQUE SULFO-MOLYBDATE DE SODIUM -

1.2.1. - Préparation du mélange de minéralisation :

A la suite des observations réalisées, nous avons tenté de modifier la méthode de minéralisation en remplaçant le mélange nitro-sulfo-perchlorique par le mélange oxydant au sulfo-molybdate proposé par CUMMINS. La préparation de ce mélange s'effectue de la manière suivante :

- Faire dissoudre 10 g de molybdate de sodium dans 150 ml d'eau distillée.
- A la solution obtenue, ajouter par petites quantités et tout en refroidissant 150 ml d'acide sulfurique concentré.
- Au mélange obtenu, ajouter 200 ml d'acide perchlorique à 70-72 %.

1.2.2. - Réactif :

Molybdate de sodium : pur - PROLABO.

1.2.3. - Minéralisation :

La technique de dosage est la même : au résidu d'évaporation de 20 à 25 ml d'urine alcalinisée au préalable par addition de lessive de soude, ajouter 5 ml du mélange oxydant et chauffer sur un bec bunsen en présence de réfrigérant ascendant, à feu doux pour éviter la formation de mousse qui peut adhérer aux parois de l'erlen et se carboniser par la suite. Augmenter la température progressivement et chauffer à ébullition douce pendant 15 à 20 minutes. Au bout de ce temps, la solution se décolore après avoir viré de la coloration brune au brun jaunâtre, au jaune clair. Eviter le charbonnement.

Si la décoloration n'a pas lieu, ajouter 2 à 3 ml de mélange oxydant.

Le reste du dosage s'effectue suivant la méthode déjà décrite.

1.2.4. - Dosage du sélénium dans les urines :

On a réalisé le dosage du sélénium dans l'urine d'un individu non exposé selon la méthode décrite ci-dessus. Le dosage a été effectué en ayant recours à la méthode des ajouts.

DOSAGE N°	PRISE D'ESSAI D'URINE	SOLUTION DE SELENITE DE SODIUM à 2 µg/ml dans HCl à 1%	ABSORBANCE A 420 mn (cuves de 4 cm, E ₂)	
1	20 ml	0 ml	0,215	{ M = 0,230
2	20 ml	0 ml	0,245	
3	20 ml	2 ml	0,375	{ M = 0,376
4	20 ml	2 ml	0,377	
5	20 ml	4 ml	0,535	{ M = 0,5735
6	20 ml	4 ml	0,612	

- Volume final : 27 ml.

- Volume de toluène utilisé pour l'extraction : 5,3 ml.

1.2.5. - Discussion :

1.2.5.1. Rendement :

A 4 µg, correspond une absorbance de 0,376 - 0,230 = 0,146, et à 8 µg une absorbance de 0,5735 - 0,230 = 0,3435.

L'absorbance moyenne correspondant à 1 µg de sélénium est de 0,040 pour un volume final de 27 ml extrait avec 5,3 ml de toluène.

En admettant l'existence d'une relation linéaire entre l'absorbance et la concentration en sélénium-diamino-3,3' benzidine, il est possible d'appliquer la règle de trois permettant de donner l'absorbance relative à un volume de 4 ml d'extrait. Cette absorbance serait de 0,053.

Or, à 1 µg, correspond une absorbance de 0,086. Par suite, le rendement de la méthode sera de : $\frac{0,053}{0,086} = 61,6 \%$.

1.2.5.2. Spécificité :

Au spectre d'absorption caractéristique du complexe sélénium-diamino-3,3' benzidine, s'ajoute souvent une coloration non spécifique masquant le maximum d'absorption et entraînant une mauvaise reproductibilité.

Cette coloration serait due :

- à l'absorption à partir de la matière organique en cas de minéralisation insuffisante ;
- à la présence dans la solution de certains "constituants" distillables à la température de minéralisation, soit colorés, soit capables de réagir avec la coloration formée pour donner un dérivé coloré extractible par le toluène au même pH que le complexe formé entre le sélénium et la diamino-3,3' benzidine.

Cependant, par prolongation de la durée de minéralisation de 10 minutes (cas du mélange acide perchlorique - sulfo-molybdate, 30 minutes au total), ou par élimination du réfrigérant ascendant (cas de l'acide nitrique) et par réduction de la prise d'essai, nous avons réussi à améliorer la reproductibilité et à obtenir le spectre caractéristique du complexe sélénium - diamino-3,3' benzidine.

1.2.6. - Evaluation des pertes au cours du dosage :

1.2.6.1. Principe :

Il s'agit de mesurer les pertes en sélénite de sodium après évaporation et minéralisation des urines en présence d'une quantité traceuse de sélénite de sodium radioactif $\text{SeO}_3\text{Na}_2 \text{Se}^{75}$.

1.2.6.2. Matériel et réactifs :

- Sélénite de sodium Se^{75} ($\text{SeO}_3\text{Na}_2 \text{Se}^{75}$) (CEA : Se-75-5-3) d'activité spécifique de 60 mCi par mg. Sa période de demi-vie est de 120 jours.

On dispose d'une solution d'activité spécifique de 188.000 ipm/ μl correspondant approximativement à $2.10^{-2} \mu\text{g}$ de sélénium.

- Spectromètre gamma PACKARD.

1.2.6.3. Méthode :

1.2.6.3.1. - PREPARATION DES ECHANTILLONS :

Les échantillons d'urine, additionnés d'une quantité traceuse de sélénite de sodium radioactif, passent par trois étapes :

- une concentration par dessiccation à l'étuve à 70-80°C ;
- une minéralisation par le mélange sulfo-molybdique ;
- une extraction finale par le toluène.

1.2.6.3.2. - ECHANTILLONNAGE :

Les mesures ont porté sur deux séries :

- PREMIERE SERIE : 6 échantillons ont reçu chacun une dose traceuse de sélénite de sodium Se^{75} :

- Echantillons 1 et 2 : 20 ml d'eau additionnés de 4 μg de sélénite de sodium froid.
- Echantillons 3 et 4 : 20 ml d'urine.
- Echantillons 5 et 6 : 20 ml d'urine additionnés de 4 μg de sélénite de sodium froid.

Dans cette série, tous les échantillons donnent lieu à des mesures d'activité à chaque stade de la manipulation. Les résultats observés sont regroupés dans le tableau suivant (p. 181).

Interprétation des résultats :

- Echantillons 1 et 2 : la perte en radioactivité totale mesurée après l'étape de minéralisation est inférieure à celle mesurée après la dessiccation. Ceci n'a lieu que dans le cas d'eau distillée. Ce phénomène peut être expliqué par une mauvaise redissolution du précipité de sélénite de sodium après dessiccation à l'étuve et, probablement aussi, par adsorption du précipité aux parois des tubes.
- Echantillons 3, 4, 5 et 6 : la perte moyenne en sélénite après l'étape de minéralisation est de 19,45 avec un écart-type absolu de 8,41 et relatif de 43,2 %. Le rendement est de 80,55 % avec un écart-type absolu de 8,41 et relatif de 10,4 %. La perte moyenne après dessiccation est de 14,93 %.

Cet essai nous a permis d'avoir une idée générale sur l'évolution de la radioactivité de la solution au cours des différentes étapes du dosage. Cependant, le nombre d'observations est insuffisant. La nécessité d'évaporer à sec de nouveau la solution après comptage de la radioactivité à la suite de la première étape de dessiccation (résidu redissous dans 20 ml d'eau) ne permet pas de donner une conclusion précise et indiscutable. Pour cette raison, l'évolution de la radioactivité et l'évaluation des pertes à chaque étape ont été testées de nouveau sur un grand nombre d'échantillons. Pour les résultats observés, une interprétation statistique sera faite.

ECHANTILLON	ACTIVITE TOTALE (ipm)	ACTIVITE APRES EVAPORATION (ipm)	PERTE %	ACTIVITE APRES MINE- RALISATION (ipm)	PERTE %	ACTIVITE APRES EXTRACTION (ipm)	PERTE TOTALE %	RENDEMENT %
1	1.528.600	776.200	49,2	901.200	41,0	517.580	66,1	33,4
2	1.513.000	1.230.600	18,7	1.247.400	17,6	672.700	55,5	44,5
3	1.514.600	1.379.600	8,9	1.281.600	15,4	961.030	36,5	63,5
4	1.442.200	1.469.200	0	1.326.200	8,0	611.660	57,6	42,4
5	1.706.000	1.332.000	21,9	1.289.800	24,4	892.710	47,7	52,3
6	1.652.600	1.174.200	28,9	1.156.400	30,0	897.750	45,7	54,3

- DEUXIEME SERIE : 20 échantillons ont reçu chacun 23,9 ng de sélénite de sodium radioactif $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \text{ Se}^{75}$ (1,5 μCi). Les échantillons, numérotés de 1 à 20, sont mesurés dans les conditions suivantes :

- Echantillons 1 à 5 : mesure de la radioactivité après dessiccation.
- Echantillons 6 à 15 : mesure de la radioactivité après minéralisation.
- Echantillons 16 à 20 : mesure de la radioactivité de la phase aqueuse après extraction.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau (p. 183).

Interprétation des résultats :

- Le rendement de la méthode, à la fin de la minéralisation, est de 81,54 %. La valeur observée est très voisine de celle trouvée pour la première série. Par suite, l'évaporation de l'échantillon après une première évaporation à sec et redissolution n'entraîne pas de pertes appréciables.
- Bien qu'on se soit placé dans les conditions optimales d'extraction, 60,9 % de la radioactivité est retrouvée dans la phase aqueuse.

1.2.6.4. Conclusions :

Le comptage de la radioactivité s'effectue, à chaque fois, sur une prise d'essai de 100 μl . La reproductibilité dépend énormément de la précision de la méthode de prélèvement et de l'homogénéité du milieu. Dans le cas d'urine, la dissolution du résidu d'évaporation peut ne pas être complète et des particules de dimensions variables existent en solution. Ces particules peuvent aussi ne pas passer à travers la micro-pipette de prélèvement.

La perte en sélénite de sodium additionné à l'eau, après évaporation à sec et déterminée par spectrocolumétrie, est la suivante (p. 185) :

ECHANTILLON	ACTIVITE TOTALE (ipm)	ACTIVITE APRES EVAPORATION (ipm)	PERTE %	ACTIVITE APRES MINE- RALISATION (ipm)	PERTE %	ACTIVITE APRES EXTRACTION (ipm)	PERTE TOTALE %	RENDEMENT %
1	879.400	766.200	12,9					
2	899.600	782.100	13,1					
3	899.000	769.100	14,5					
4	902.600	755.900	16,3					
5	874.200	783.000	10,4					
6	890.600			724.200	18,7			
7	907.600			733.000	19,2			
8	877.600			714.700	18,6			
9	855.800			695.000	18,8			
10	894.200			727.300	18,7			

11	852.200			778.800	8,6						
12				732.100	18,0						
13				765.000	16,1						
14				665.000	25,8						
15				698.700	22,1						
16						532.900	40,9	59,1			
17						557.680	37,5	62,5			
18						535.600	39,4	60,6			
19						565.820	36,6	63,4			
20						529.760	41,2	58,8			
PERTES MOYENNES					18,46 s = $\pm$ 4,36						
					13,4 s = $\pm$ 2,1						

DOSAGE N°	ABSORBANCE A 420 nm (cuves de 4 cm, E ₂)	
	Prise d'essai contenant 8 µg de sélénium (Na ₂ SeO ₃). Volume final de 20 ml extrait avec 4 ml de toluène.	Prise d'essai de 20 ml contenant 8 µg de sélénium (sélénite de sodium), évaporée à sec. Volume final de 20 ml extrait avec 4 ml de toluène.
1	0,73	0,675
2	0,673	0,668
3	0,70	0,692
4	0,65	0,683
5	0,675	0,714
6	0,735	0,705
Moyenne...	0,6938	0,6895
Ecart-type absolu....	0,03.10	0,0161
Ecart-type relatif...	4,46 %	2,33 %

Le rendement observé après l'évaporation à sec est de 99,38 %. La différence observée entre les deux moyennes avant et après dessiccation n'est pas significative. Le test de Student appliqué donne pour le coefficient une valeur de $\pm 0,278$.

La méthode d'évaluation des pertes par comptage de la radioactivité a été ainsi abandonnée pour les raisons suivantes :

- la non-reproductibilité de la méthode caractérisée par des écarts-types relativement importants ;
- les erreurs observées et les fausses hypothèses et conclusions qu'elle peut entraîner. L'exemple le plus frappant est celui qu'on vient de citer : alors qu'en spectrophotométrie le rendement observé, après évaporation à sec d'une prise d'essai de 20 ml renfermant 8 µg de sélénium sous forme de sélénite de sodium, est de 99,38 %, ce dernier ne dépasse guère 50,8 % et 81,3 %, respectivement, lors d'un dosage radioactif.

1.2.7. - Modifications apportées à la méthode de minéralisation par le mélange acide perchlorique - sulfo-molybdate de sodium :

1.2.7.1. Echantillonnage - Minéralisation :

La minéralisation est effectuée directement, sans évaporation préalable de l'urine, et ceci en raison de la volatilité de certains métabolites, notamment du triméthyl-sélénium qui présente un point d'ébullition voisin de 56°C. Le volume de la prise d'essai a été amené à 10 ml et celui du mélange oxydant à 7 ml, ceci a été jugé nécessaire et suffisant pour réaliser la minéralisation complète en présence d'une concentration adéquate en mélange oxydant.

La minéralisation se fait au bain de sable porté à une température constante de 200 à 220°C. Ceci permet de réaliser un meilleur contrôle de la température que lors du chauffage sur le bec bunsen.

On a constaté, d'autre part, que lors de la prolongation de la durée de minéralisation de 10 minutes et en l'absence ou non de réfrigérant ascendant, il y a apparition du spectre caractéristique du complexe sélénium - diamino-3,3' benzidine avec un maximum d'absorption à 420 nm.

L'absence du maximum d'absorption à 420 nm est due à une minéralisation incomplète de la matière organique présente dans la prise d'essai.

1.2.7.2. Application au dosage du sélénium dans les urines :

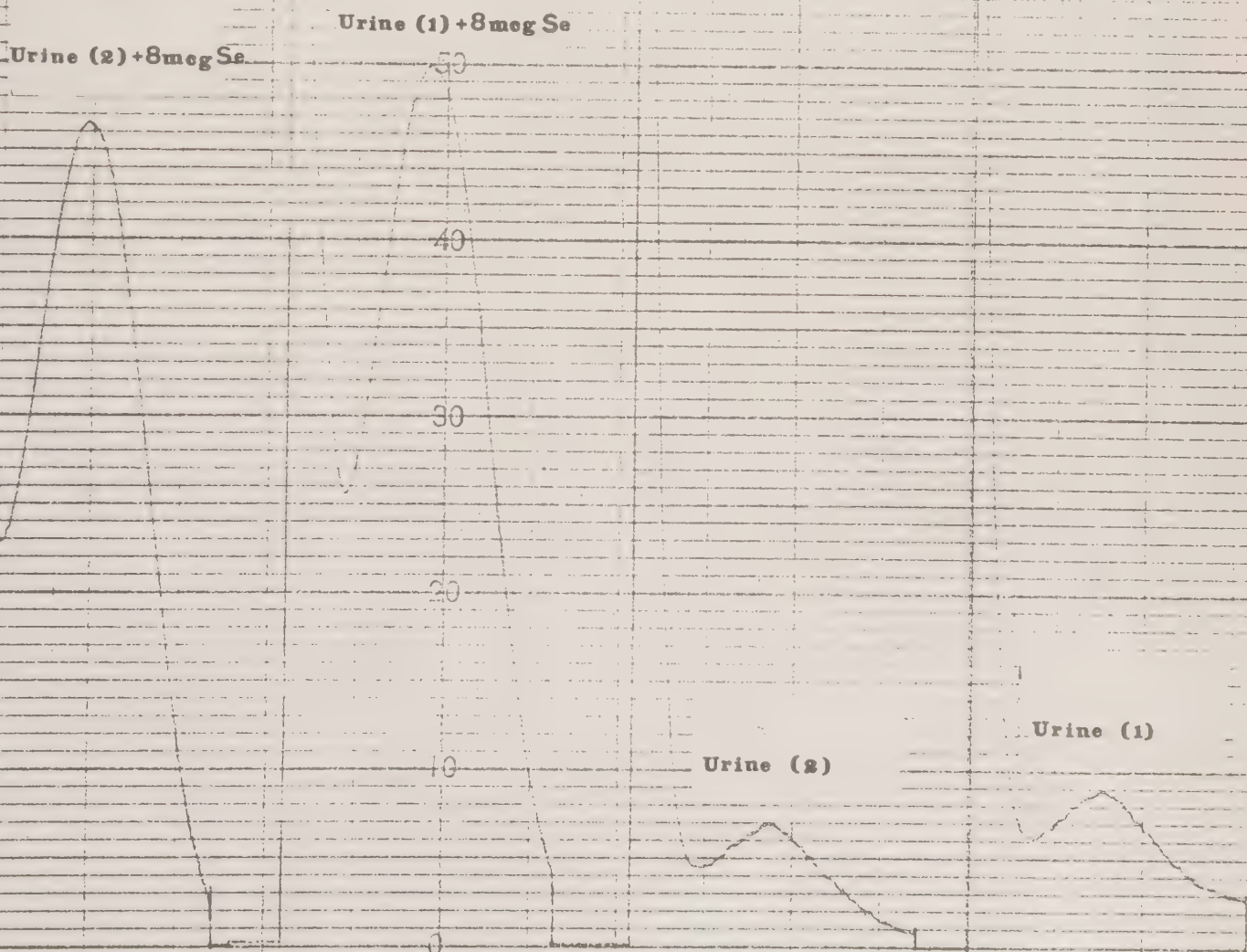
La méthode ainsi modifiée a été appliquée sur les urines provenant du personnel manipulant du sélénium ou supposé intoxiqué par le métalloïde. Le dosage a été effectué sur une prise d'essai de 10 ml d'urine. De chaque urine, nous avons effectué trois prélèvements de 10 ml chacun ; deux de ces trois prélèvements ont été additionnés successivement de

4 et 8 µg de sélénium sous forme de sélénite de sodium. Un blanc réactif a été aussi préparé. Le volume final a été de 35 ml et, par suite, extrait avec 7 ml de toluène.

Les résultats observés sont résumés dans le tableau ci-dessous :

	ABSORBANCE LUE A 420 nm cuves de 4 cm, E ₂	ABSORBANCE CORRIGEE	TENEUR EN SELENIUM (µg/litre)
Blanc réactif.....	0,032	0,032	
Urine 1.....	0,09	0,058	114,6
Urine 1 + 4 µg Se.....	0,290	0,258	
Urine 1 + 8 µg Se.....	0,500	0,468	
Urine 2.....	0,07	0,038	76,4
Urine 2 + 4 µg Se.....	0,270	0,238	
Urine 2 + 8 µg Se.....	0,465	0,433	
Urine 3.....	0,075	0,043	81,3
Urine 3 + 4 µg Se.....	0,290	0,258	
Urine 3 + 8 µg Se.....	0,480	0,448	
Blanc réactif + 4 µg Se	0,220	0,188	
Blanc réactif + 4 µg Se	0,230	0,198	
Blanc réactif + 8 µg Se	0,440	0,408	
Blanc réactif + 8 µg Se	0,420	0,388	

Dosage du SELENIUM: Minéralisation par le mélange
 $\text{HClO}_4 - \text{H}_2\text{SO}_4 - \text{Na}_2\text{MoO}_4$



La limite de détection de la méthode n'est pas suffisante pour permettre le dosage du sélénium à l'état de traces. Cette limite de détection a été calculée à partir de l'écart-type correspondant à la moyenne d'absorbance de 6 blancs réactifs. Les valeurs observées sont les suivantes :

BLANC REACTIF N°	ABSORBANCE A 420 nm (cuves de 4 cm, E ₂)	ABSORBANCE EXPRIMEE en µg de sélénium
1	0,03	0,61
2	0,040	0,82
3	0,045	0,92
4	0,030	0,62
5	0,060	1,22
6	0,035	0,71
Moyenne.....	0,040	0,82
Ecart-type.....	0,010	0,21

Pour une précision de 99 %, la limite de détection sera égale à 3 fois l'écart-type observé. Elle sera de 63 µg de sélénium par litre. Elle est insuffisante pour détecter des traces de sélénium, mais cependant elle permet de doser cet élément chez les sujets intoxiqués.

Nous avons envisagé la possibilité d'oxydation du sélénite en séléniat au cours de la minéralisation. Pour cela, deux prises d'essai renfermant chacune 8 µg de sélénium (4 ml de solution de sélénite de sodium à 2 µg de sélénium/ml) ont été portées à ébullition douce en présence de 7 ml de mélange oxydant. Le dosage s'effectue comme précédemment. Deux blancs réactifs ont été préparés.

	ABSORBANCE
Blanc réactif (1)...	0,025
Blanc réactif (2)...	0,060
8 µg de sélénium (1)	0,405
8 µg de sélénium (2)	0,449

A 1 µg de sélénium, correspond une absorbance de 0,048. A cette absorbance, correspond un rendement de 98 %. Vu le nombre limite des observations, la différence observée n'est pas significative.

1.2.7.3. Applications :

Cette méthode a été utilisée provisoirement pour le dosage du sélénium dans les urines de sujets intoxiqués. Les valeurs trouvées sont rapportées dans le tableau suivant :

SUJET N°	DIURESE	TENEURS EN SELENIUM (µg/litre)
1	1.000	90
2	1.700	285
3	1.650	100
		88
4	850	65
		65
5	850	95
6	?	160

Elle a servi aussi au dosage du sélénium dans certains tissus animaux : reins et foie du cheval. Les teneurs trouvées sont les suivantes :

ORGANE	TENEUR
Reins.....	2,52 ppm
Foie.....	2,25 ppm
	2,25 ppm

- INTERPRETATION DES RESULTATS :

- Urines :

Avant de conclure à une intoxication professionnelle, il a fallu déterminer les teneurs en sélénium des urines provenant de sujets sains non exposés. Plusieurs tentatives ont été réalisées au laboratoire : aucune valeur n'a pu être retenue puisque les quantités de sélénium présentes étaient inférieures à la limite de détection de la méthode. Cependant, en se référant aux travaux de GLOVER et d'autres qui ont montré que les teneurs normales des urines peuvent aller de 0 à 100 µg sans aucune crainte d'intoxication, nous avons conclu que seuls les deux échantillons 2 et 6 renferment des quantités significatives d'une exposition professionnelle au sélénium.

- Tissus animaux :

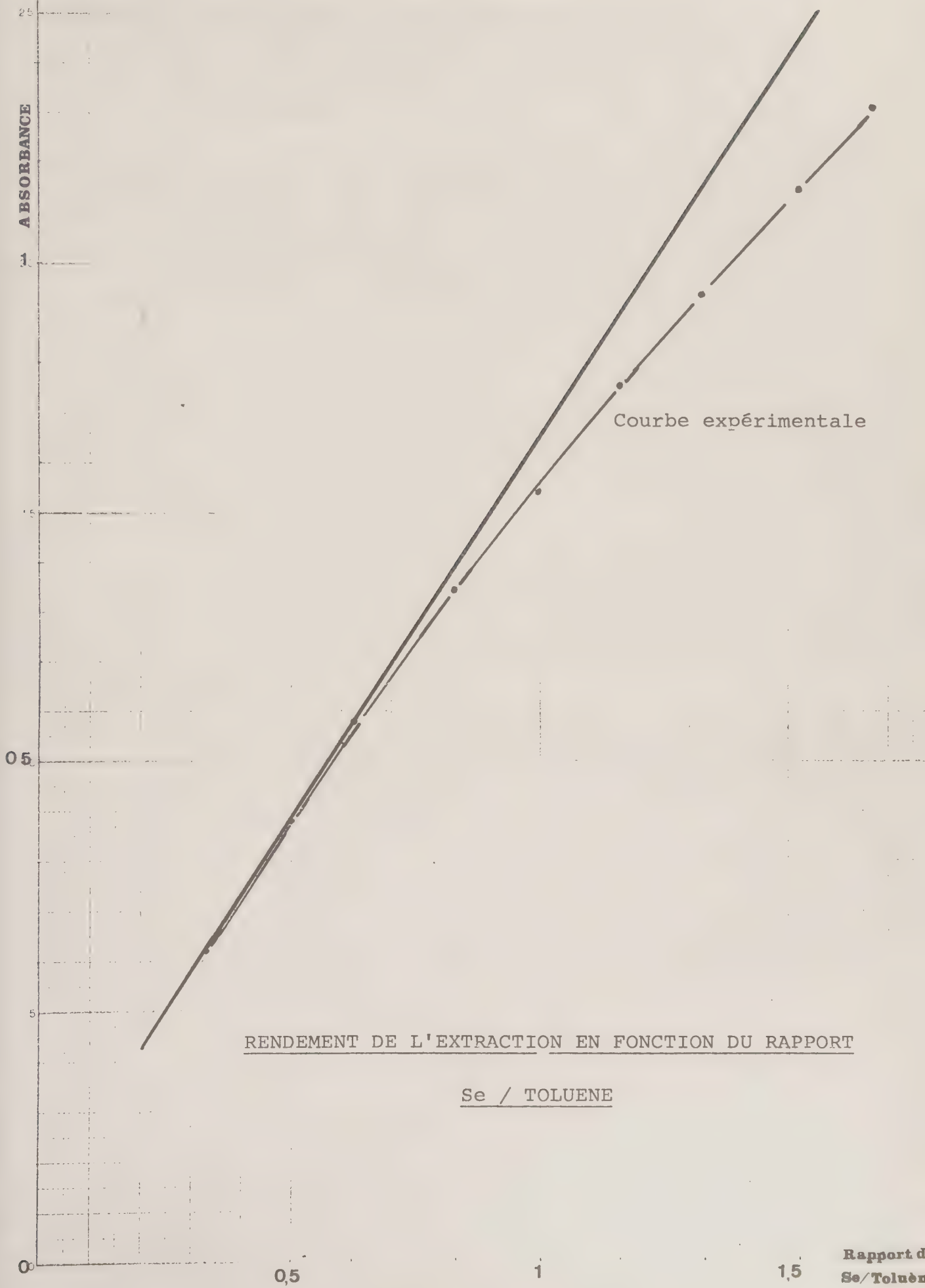
Ces échantillons nous ont été transmis par des vétérinaires suspectant des intoxications au sélénium (étiologie accidentelle ou sur dosage médicamenteux).

Les résultats concernant le foie et les reins donnent des valeurs normales et la suspicion est à rejeter.

1.2.7.8. Autres améliorations :

Afin d'améliorer la sensibilité de la méthode, nous avons envisagé de réduire le volume de la phase organique extractible (toluène). Un volume final de 30 ml renfermant 5 µg de sélénium sous forme de sélénite de sodium a été extrait avec des volumes différents de toluène. Le tableau ci-dessous résume les travaux effectués et les résultats observés :

VOLUME DE TOLUENE	RAPPORT TOLUENE/EAU	RAPPORT Se/TOLUENE	ABSORBANCE
15	1/2	0,33	0,31
10	1/3	0,50	0,44
7,5	1/4	0,67	0,54
6	1/5	0,83	0,67
5	1/6	1,0	0,77
4,3	1/7	1,16	0,88
3,75	1/8	1,33	0,97
3,3	1/9	1,52	1,075
3,0	1/10	1,67	1,16



Les trois premières valeurs obtenues sont linéaires. La non-linéarité qui suit n'est pas due à la non-application de la loi de BEER-LAMBERT (puisque cette dernière est valable jusqu'à une concentration de 2 μg par ml), mais à une saturation de la phase organique et une baisse du rendement de l'extraction.

Ce rendement est maximal pour un rapport toluène/eau variant de 1/2 à 1/4. A partir de cette valeur, on observe une diminution relative de l'absorbance. Cependant, le gain en absorbance l'emporte sur la perte par saturation de la phase organique. Ainsi, pour un volume final de 30 ml extrait avec 7,5 ml de toluène, la sensibilité de la méthode est multipliée par un facteur de 1,6 environ lorsque le volume du toluène est réduit à 4 ml.

2. RECHERCHE D'UNE METHODE DE MINERALISATION

2.1. INTRODUCTION -

Plusieurs méthodes de minéralisation ont été proposées pour le dosage du sélénium dans les matières végétales et biologiques. Ces méthodes ont été déjà revues en détail. Nous constatons que trois de ces méthodes seulement ont été appliquées au dosage du sélénium dans les urines. Il s'agit de la technique de VERIMONT, ROQUEBERT et TAUSSKY. GLOVER, dont les travaux datent de 1967 et qui sont les plus récents dans ce domaine, a utilisé le mélange sulfonitrique additionné d'oxyde de mercure pour la minéralisation des urines. Le sélénium a été ensuite séparé par distillation en présence de brome et d'acide bromhydrique, puis précipité à l'état de sélénium élémentaire par le sulfite et dosé par titrimétrie suivant la méthode de VERIMONT. La limite de détection de la méthode était de 10 µg/litre seulement malgré un volume de prise d'essai de 300 ml. Un autre inconvénient est le temps nécessaire au dosage et la durée de minéralisation qui est assez longue, d'où la possibilité de perte par entraînement.

TAUSSKY a effectué la minéralisation par voie sèche, par combustion par l'oxygène dans une fiole de Schoeniger. Le rendement de la méthode n'a pas été calculé pour les urines. Cependant, il est certain que la totalité du sélénium n'est pas libérée à partir des cendres de combustion. Cette méthode n'a servi à aucune enquête en vue de déterminer les teneurs en sélénium dans les urines.

ROQUEBERT a utilisé la méthode de calcination en milieu alcalin après dissolution dans l'acide nitrique et le nitrate de magnésium. Le dosage colorimétrique est effectué après séparation de l'élément par distillation. Le rendement de cette méthode est relativement faible.

Face à ces observations, on peut conclure :

- qu'aucune méthode de microdosage n'a été utilisée ;
- que les méthodes usuelles ne sont pas suffisamment sensibles. Dans la majorité des cas, le rendement n'a pas été mentionné.

2.2. CHOIX DU MELANGE DE MINERALISATION -

Plusieurs mélanges de minéralisation peuvent être utilisés. Cependant, certaines observations faites permettent d'en retenir certains et d'en rejeter d'autres :

- L'ion SO_4^{--} en solution entraîne la précipitation de la diamino-3,3' benzidine et du diamino-2,3 naphthalène. L'acide sulfurique pur pour analyse renferme, comme il a été déjà mentionné à plusieurs reprises, des traces de sélénium.
- Le vanadium V, présent en solution et agissant en tant que catalyseur de la minéralisation, interfère avec le sélénium. Il joue le rôle d'oxydant vis-à-vis de la diamino-3,3' benzidine et de la plupart d'autres réactifs organiques.
- Le mélange nitro-perchlorique, utilisé pour la minéralisation des substances végétales et retenu comme méthode officielle par l'A.O.A.C. aux Etats-Unis, semble être le mieux adapté au dosage final du sélénium parce qu'il présente le moins d'inconvénients pour les réactifs utilisés en fluorimétrie. La température d'ébullition est d'environ 120°C.

Les deux premières observations ont amené la plupart des analystes à réaliser la séparation du sélénium du milieu avant le dosage proprement dit, ce qui rendait les méthodes de dosage longues et abaissait, comme il était prévu, le rendement de ces dernières.

Nous avons réalisé notre étude sur des prises d'essai de 2 ml d'urine provenant d'un individu normal. Ces 2 ml ont été additionnés d'un mélange acide nitrique - acide perchlorique, dont les proportions en acide nitrique et acide perchlorique variaient de la manière suivante :

2,5 ml HNO_3 , 2,5 ml HClO_4 ; 5 ml HNO_3 , 2,5 ml HClO_4 ;
7,5 ml HNO_3 , 2,5 ml HClO_4 et 10 ml HNO_3 , 2,5 ml HClO_4 .

La minéralisation a été réalisée dans un micro-Kjeldahl. Les résultats sont les suivants :

	A HNO ₃ 2,5 ml HClO ₄ 2,5 ml	B HNO ₃ 5 ml HClO ₄ 2,5 ml	C HNO ₃ 7,5 ml HClO ₄ 2,5 ml	D HNO ₃ 10 ml HClO ₄ 2,5 ml
1	32	30	39	35
2	30	32	34	35,5
3	32,5	33	35,5	37
4	33	23,5	35,5	38,5
5	33	28	37,5	36
6	31	32	37	35
Moyenne....	31,92	29,75	36,42	36,17
Ecart-type absolu....	1,10	3,237	1,618	1,247
Ecart-type relatif...	3,43 %	10,88 %	4,43 %	3,449 %

- N.B. : Les résultats sont exprimés en unités fluorimétriques.

La réponse optimale correspondant à une minéralisation complète est observée pour les deux derniers mélanges C et D. Les différences de moyennes C - A et C - B sont hautement significatives, le test de Student donne pour t les valeurs :

$$t_C - A = 5,18 \text{ et } t_C - B = 4,12.$$

Par contre, la différence D - C n'est pas du tout significative :

$$t_C - D = 0,27.$$

Nous retenons le mélange C pour la minéralisation.

2.3. MODE OPERATOIRE -

La minéralisation s'effectue à la température de 120°C qui est celle du point d'ébullition de l'acide nitrique, 15 à 20 minutes sont nécessaires pour faire éliminer tout l'acide nitrique. Une fois l'acide nitrique éliminé, la température monte rapidement pour atteindre 203°C qui est le point d'ébullition du mélange Azéotrope $\text{HClO}_4\text{-H}_2\text{O}$. Le minéralisat est maintenu à ébullition douce pendant une demi-heure de façon que les vapeurs $\text{HClO}_4\text{-H}_2\text{O}$ se condensent à l'intérieur du micro-Kjeldahl.

2.4. CHAUFFAGE DU RESTE PERCHLORIQUE -

La distillation de la phase perchlorique entraîne une perte en sélénium et le rendement final est abaissé.

Douze essais ont été réalisés, chacun renfermant 0,5 µg de sélénium sous forme de sélénite de sodium. 6 parmi les 12 ont subi une minéralisation normale (condensation des vapeurs $\text{HClO}_4\text{-H}_2\text{O}$ à l'intérieur du micro-Kjeldahl et ébullition douce), 6 autres une distillation du reste perchlorique. Les résultats sont les suivants :

	SANS DISTILLATION DU RESTE PERCHLORIQUE	AVEC DISTILLATION DU RESTE PERCHLORIQUE
	50	29
	53	59
	56,5	42
	51	51
	61	53
	55	37
Moyenne.....	54,42	45,17
Ecart-type absolu	3,68	10,20
Ecart-type relatif	6,96 %	22,58 %

- N.B. : Les résultats sont exprimés en unités fluorimétriques.

D'après les résultats, nous remarquons que la perte est de 13 %. La reproductibilité devient aussi moins bonne.

2.5. MANIERE A LAQUELLE

L'ELIMINATION DE L'ACIDE NITRIQUE EST EFFECTUEE -

Deux séries de dosage ont été réalisées, chacune comportant 5 essais : 2 ml d'urine ont été minéralisés en présence de quantités croissantes de sélénium : 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 et 1 μg , respectivement, ajoutés sous forme de sélénite de sodium.

La première série a subi une minéralisation rapide (élimination de l'acide nitrique en moins de 5 minutes) au bain de sable porté à 220-250°C. La deuxième série subit une minéralisation douce (élimination de l'acide nitrique en 15 à 20 minutes) au bain de sable porté à 140-160°C.

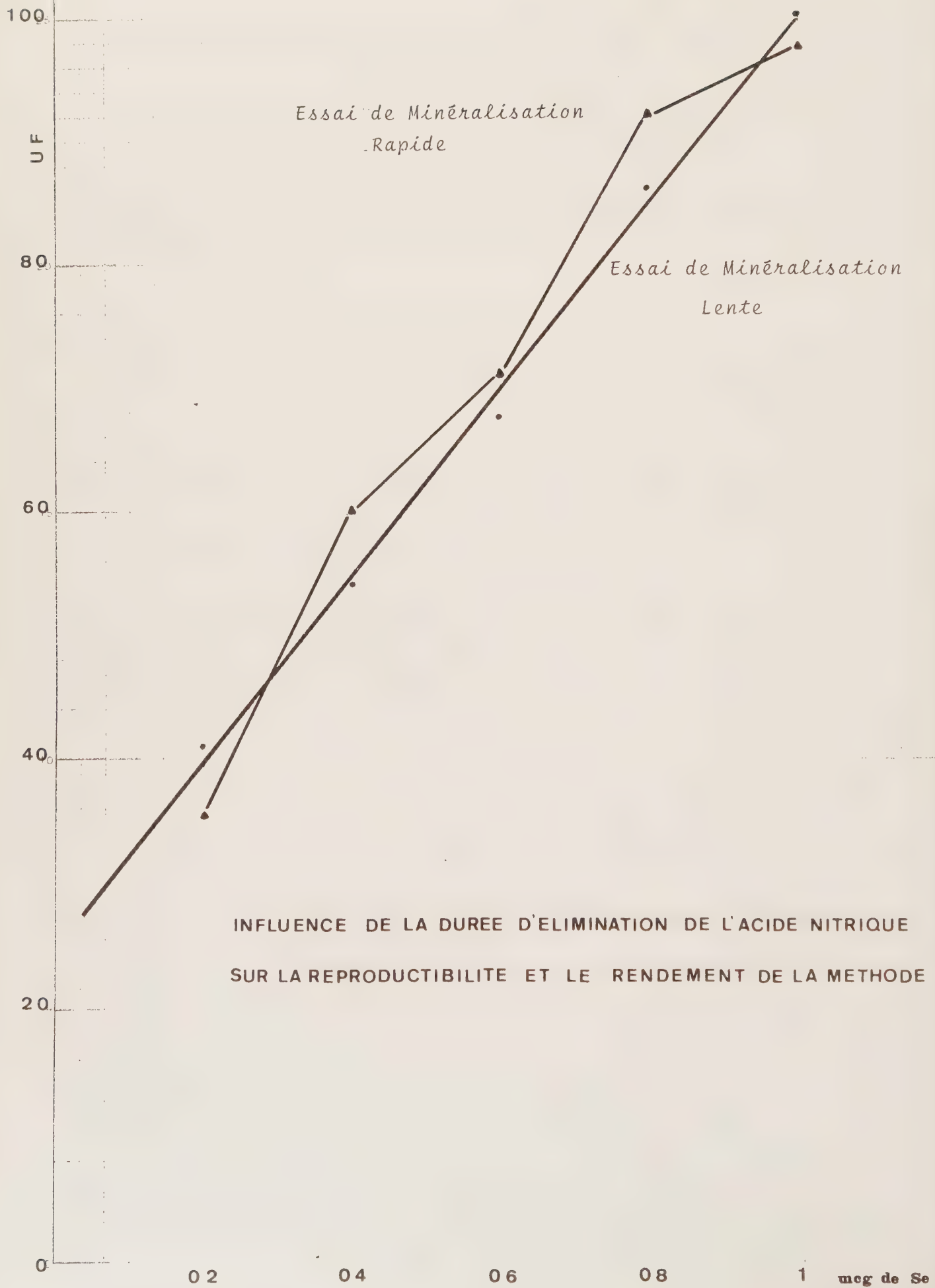
Le dosage final s'effectue avec la diamino-3,3' benzidine. Aucun blanc n'a été réalisé et le zéro de l'appareil est fait sur le toluène.

Les résultats observés sont les suivants :

	ELIMINATION RAPIDE DE L'ACIDE NITRIQUE (- 5 minutes)	ELIMINATION LENTE DE L'ACIDE NITRIQUE (15-20 minutes)
Urine + 0,2 μg ...	35,5	41
Urine + 0,4 μg ...	60	54
Urine + 0,6 μg ...	71	67,5
Urine + 0,8 μg ...	92	86
Urine + 1,0 μg ...	97,5	100
Equation de la droite.....	$y = 78 x + 24,4$	$y = 75 x + 24,7$
Coefficient de détermination r_2	0,964	0,996

- N.B. : Les résultats sont exprimés en unités fluorimétriques.

Le calcul du coefficient de détermination et l'allure de la droite montrent que dans le cas où l'élimination de l'acide nitrique s'effectue lentement la linéarité et, par suite, la reproductibilité, seront meilleures.



2.6. POURCENTAGE D'OXYDATION

DU SELENIUM PRESENT DANS LES URINES EN SELENIATE -

Cet essai a été réalisé en même temps que le choix du mélange de minéralisation. 2 ml d'urine provenant d'un individu normal ont subi le même processus de minéralisation que la série C. Seule l'addition de l'acide chlorhydrique, dans le but de transformer le séléniate en sélénite, a été omise.

Les résultats sont les suivants :

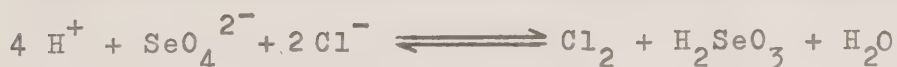
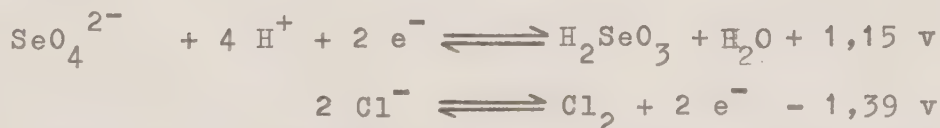
	1	2	3	4	5	6	MOYENNE
Série C.....	29	34	35,5	37,5	37	35,5	36,42
Minéralisation sans réduction par l'HCl	29	32	31,9	30,5	33,5	35	31,92

- N.B. : Les résultats sont exprimés en unités fluorimétriques.

8,8 % de sélénium présent ne réagit pas avec le diamino-2,3 naphtalène. Donc, 8,8 % de sélénium existe à l'état de séléniate Se VI. Cette valeur obtenue nous semble satisfaisante puisque WATKINSON a rapporté que 60 % de sélénite est oxydé en séléniate par ébullition avec l'acide perchlorique concentré pendant 4 heures.

2.7. REDUCTION DES SELENIATES EN SELENITES -

L'acide chlorhydrique est capable de réduire le séléniate en sélénite. La réaction de réduction est la suivante :



La concentration en acide chlorhydrique doit être choisie de manière à éviter la perte en sélénium par formation de dérivés chlorés : Se_2Cl_2 dichlorure disélénium de point d'ébullition à 127°C ; le tétrachlorure de sélénium SeCl_4 est beaucoup moins volatil, son point d'ébullition est de 196°C.

La méthode proposée par OLSON consiste à ajouter 2,5 ml d'acide chlorhydrique dilué au 1/10 au minéralisat (reste perchlorique) et à effectuer la réduction en le plaçant au bain-marie bouillant pendant 30 minutes. Nous avons adopté cette méthode et nous avons étudié son rendement et son efficacité.

2.7.1. - Rendement : perte par volatilisation :

Un blanc et deux séries de dosages ont été effectués. Chaque série est constituée de 5 échantillons renfermant 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 et 1 μg de sélénium (solution de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La première série a été analysée directement, l'autre a été analysée après addition de 2,5 ml d'acide chlorhydrique dilué au 1/10 et chauffage au bain-marie bouillant pendant 30 minutes.

Le volume final était de 30 ml. La diamino-3,3' benzidine a été utilisée et l'extraction a été réalisée avec 3 ml de toluène.

Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant :

Blanc.....	0,2	0,4	0,6	0,8	2,0
Série I (sans HCl)	14	28	48	55	71
Série II (avec HCl)	14	30	47	55	71

- N.B. : Les résultats sont exprimés en unités fluorimétriques.

- 1^{ère} série : $y = 70,5 \text{ } x + 0,09$

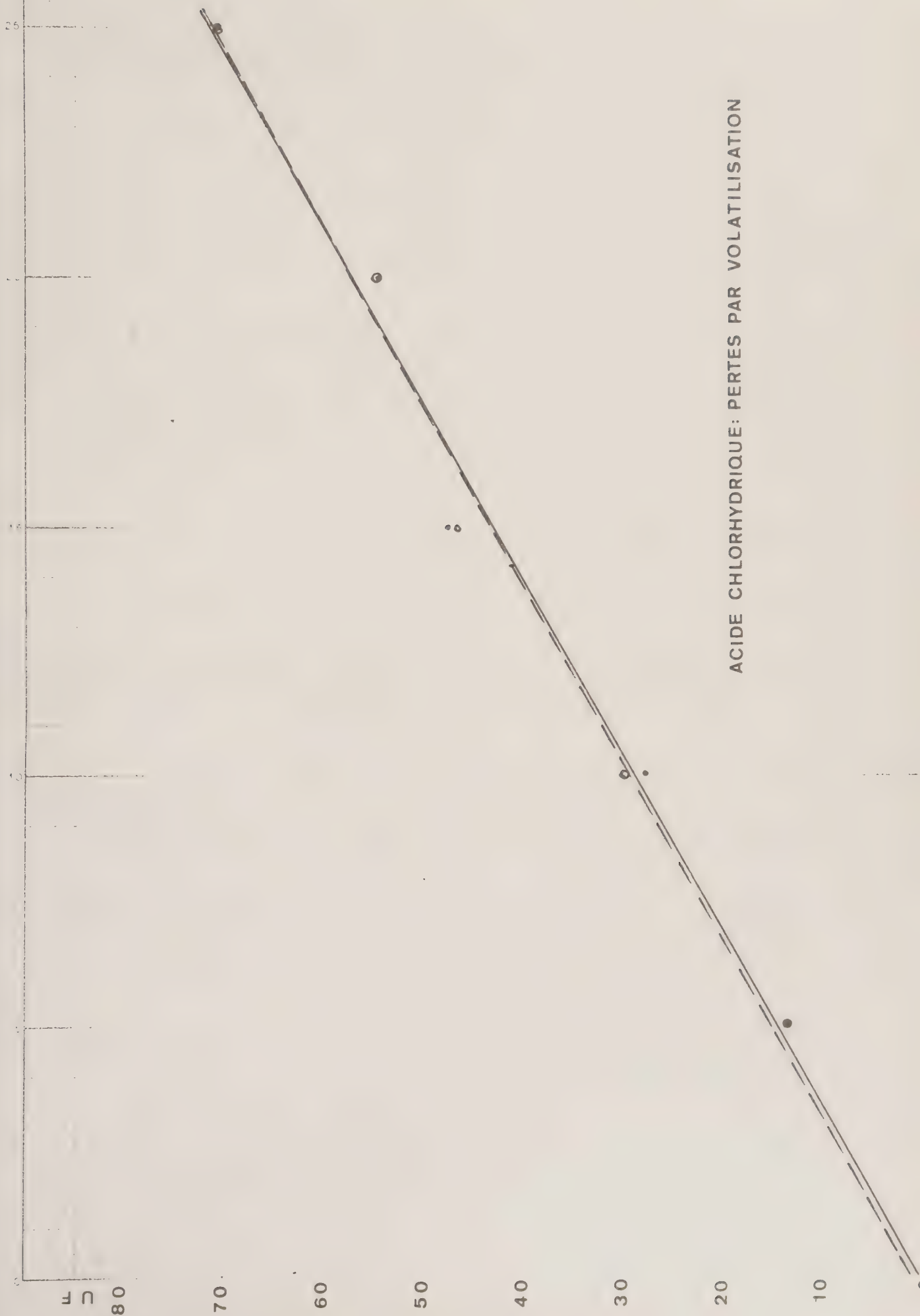
- 2^{ème} série : $y = 69,5 \text{ } x + 1,7$

Comme le montre le schéma à la page 202, les deux droites sont superposables. Aucune perte due à la formation de dérivés volatils n'est observée.

2.7.2. - Efficacité :

Là aussi, deux séries ont été préparées, renfermant les mêmes quantités de sélénium que précédemment. Le sélénium présent dans tous les échantillons est oxydé partiellement à l'état de séléniate par addition d'un ml d'eau oxygénée à 30 % et en portant le mélange à ébullition pendant 2 à 3 minutes.

ACIDE CHLORHYDRIQUE: PERTES PAR VOLATILISATION



Après oxydation, la première série est dosée directement, alors que la deuxième reçoit de l'acide chlorhydrique pour la réduction du séléniate éventuellement formé.

Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant :

Blanc.....	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Série I (sans HCl) (	6	12	16	24	32
Série II (avec HCl) (	15	28	50	57	71

- N.B. : Les résultats sont exprimés en unités fluorimétriques.

- 1^{ère} série : $y = 32 x - 1,2$

- 2^{ème} série : $y = 70,5 x + 1,9$

La réduction, comme on le voit, est complète.

2.8. INFLUENCE DE LA DUREE DE CHAUFFAGE DU RESTE PERCHLORIQUE SUR LE RENDEMENT FINAL DE LA METHODE -

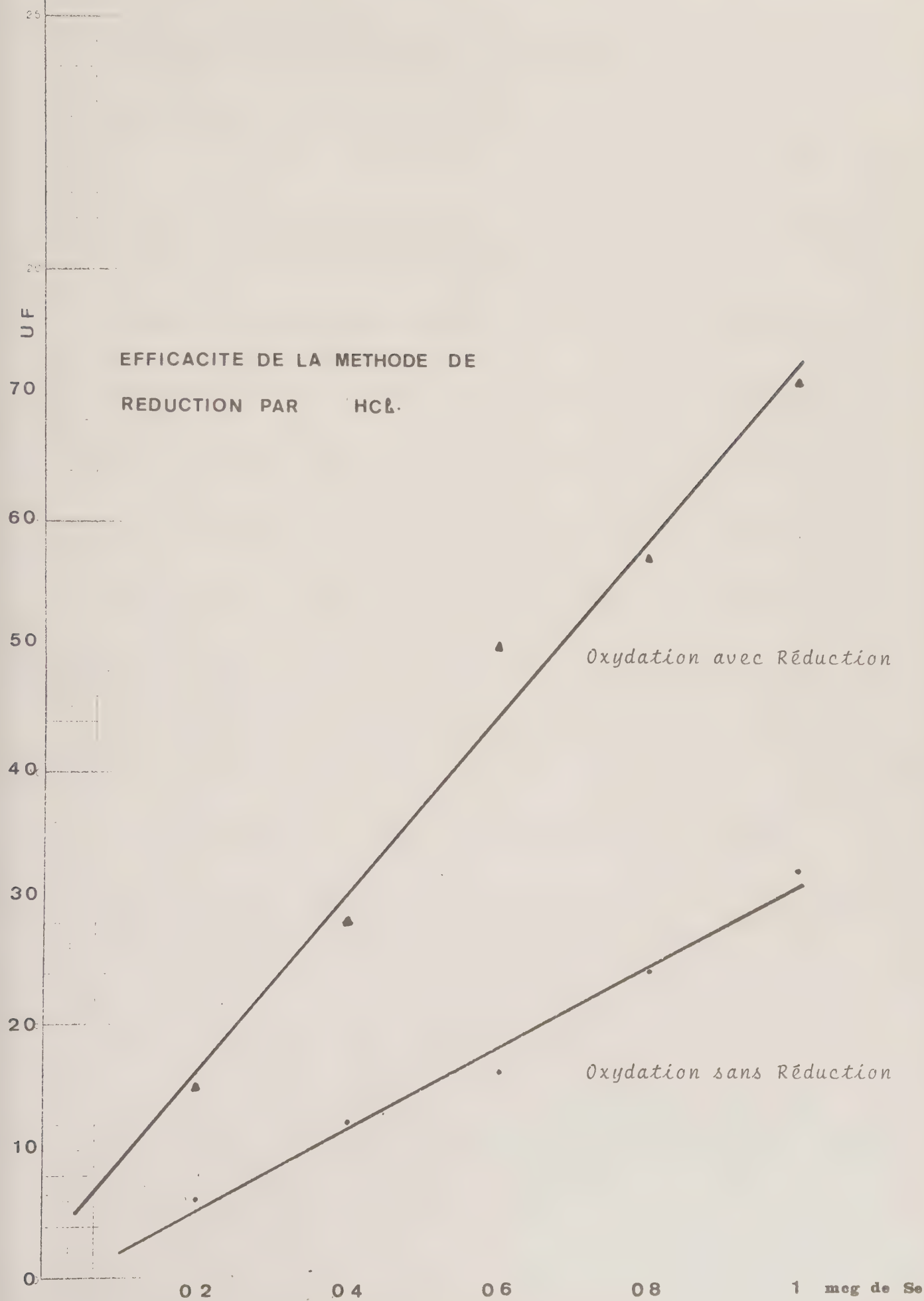
2.8.1. - Cas de la diamino-3,3' benzidine :

Nous avons réalisé l'étude sur une prise d'essai de 2 ml d'urine additionnée de 2 µg de sélénium. La digestion s'effectue par le mélange de minéralisation déjà choisi.

A la suite de l'élimination complète de l'acide nitrique, un premier micro-Kjeldahl a été retiré du bain de sable. Les six autres qui restent ont été retirés à des temps différents : 5, 10, 15, 20, 30 et 40 minutes après le premier.

Les résultats observés sont les suivants :

Durée de chauffage (en minutes)	0	5	10	15	20	30	40
Fluorescence.....	62	81	80	81,5	83	85	84,5



Nous constatons que le rendement augmente au fur et à mesure que la durée de chauffage du reste perchlorique se prolonge, il est maximal 30 minutes après.

Nous avons repris cette étude sur un plus grand nombre d'échantillons, et les résultats obtenus sont classés dans le tableau ci-après.

	t = 0	t = 15 mn	t = 30 mn	t = 60 mn
1	57,0	77	80	77
2	52,0	79,3	79,2	82
3	68,5	82	88	84,8
4	63,1	81,5	82,5	85
5	61,0	74	85,3	89
6	60,5	76	84,5	82
Moyenne.....	60,32	78,3	83,25	83,3
Ecart-type.....	5,03	2,9	3,05	3,67

- N.B. : Les résultats sont exprimés en unités fluorimétriques.

Les différences entre les moyennes correspondant à une durée de chauffage de 15 minutes et de 0 minute, d'une part, et 30 minutes et 15 minutes, d'autre part, sont toutes les deux significatives pour un seuil de sécurité de 0,01. Les coefficients de Student sont 6,92 et 2,63, respectivement.

Cette baisse de l'intensité de fluorescence est due à un phénomène de quenching provoqué par :

- soit l'oxydation de la diamino-3,3' benzidine par les nitrites et le chlore. Le chauffage du reste perchlorique permet d'éliminer toute trace de nitrites, et l'addition de quelques millilitres d'eau et leur distillation permettent d'éliminer le chlore par entraînement ;
- soit une minéralisation incomplète de la matière organique.

Nous avons repris l'étude sur 2 μg de sélénium sous forme de sélénite de sodium et en l'absence d'urine. Le maximum est atteint 15 minutes après.

	t = 0	t = 15 mn	t = 30 mn	t = 60 mn
1	57	75,5	85	77
2	54,9	80	75	85
3	61	86	83	83
4	57	83	81	88
5	69	80	79	74
6	59	77	81	78
Moyenne.....	56,92	80,25	80,67	80,8
Ecart-type.....	3,37	3,51	3,14	4,88

- N.B. : Les résultats sont exprimés en unités fluorimétriques.

Seule la différence entre les deux premières moyennes est significative.

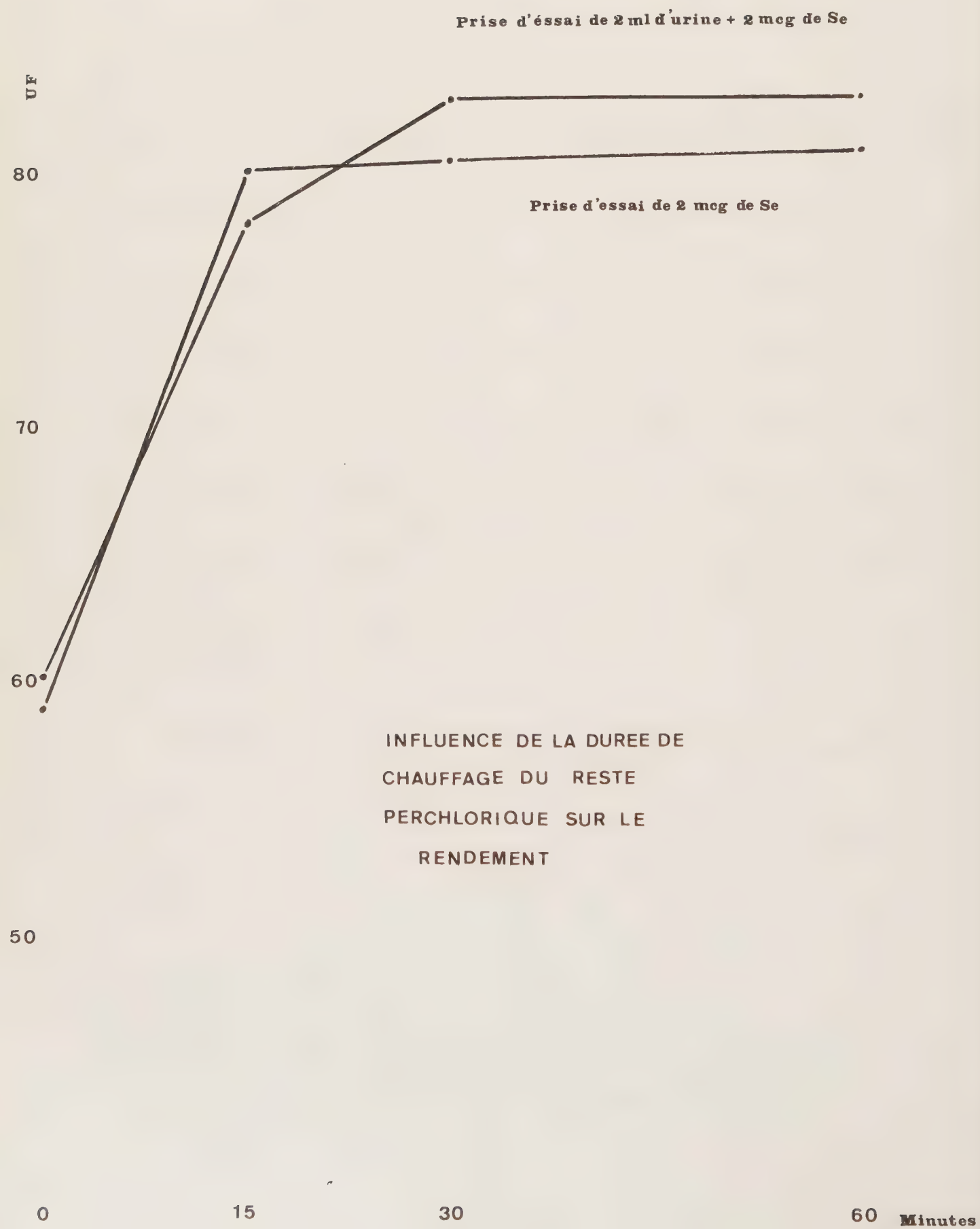
La différence entre ces deux séries de résultats montre bien l'influence de la matière organique sur le rendement de fluorescence.

- PHENOMENE DE QUENCHING :

La diamino-3,3' benzidine peut s'oxyder :

- en milieu aqueux, exposé à l'air libre ;
- en présence de traces de nitrites, d' H_2O_2 ou de chlore.

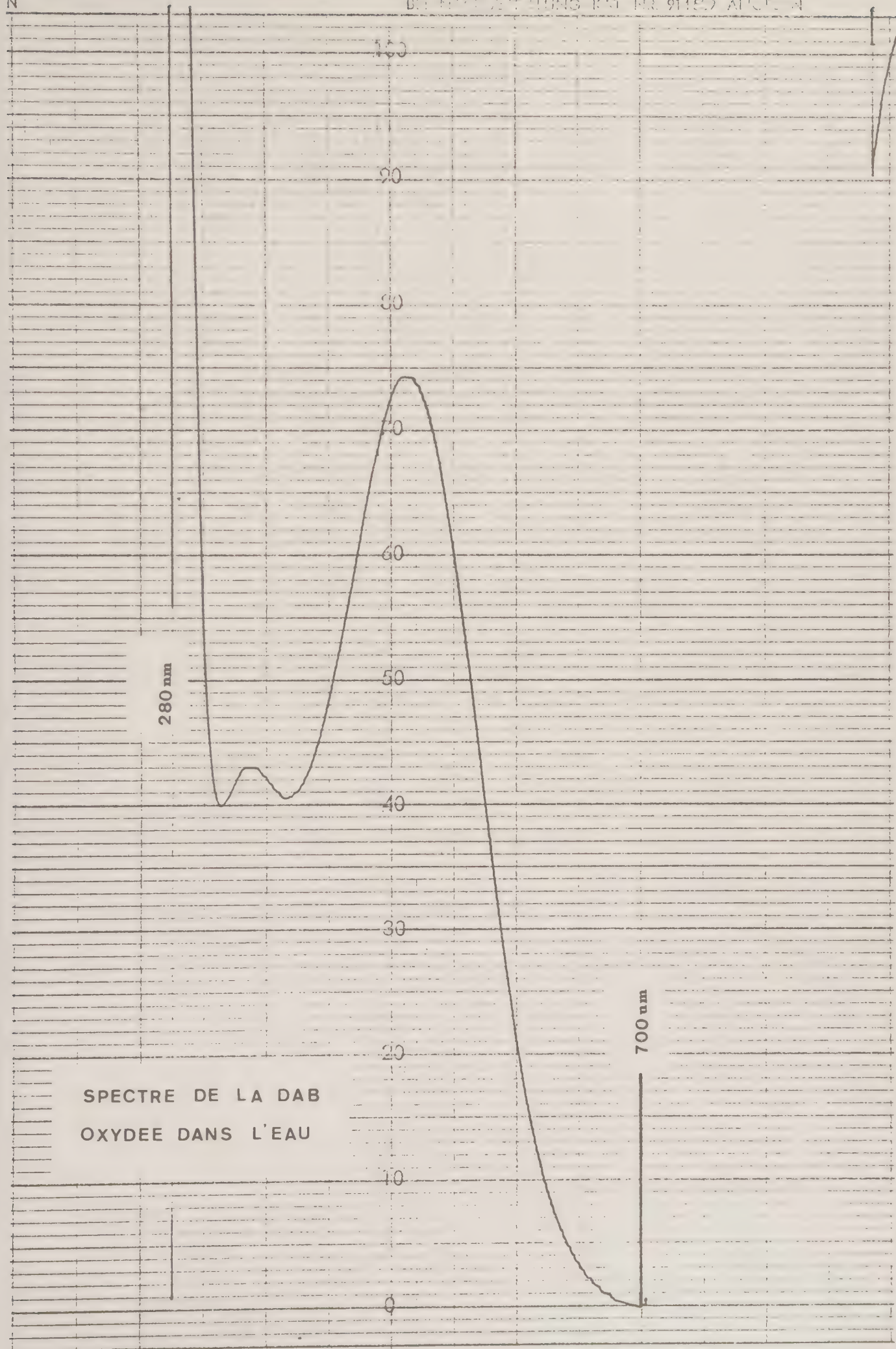
Le spectre de la diamino-3,3' benzidine oxydée dans l'eau est tracé entre 280 et 700 nm. Il s'agit d'une solution à 0,5 % de diamino-3,3' benzidine exposée à l'air libre pendant 24 heures. Deux cuves de 4 cm sont utilisées.

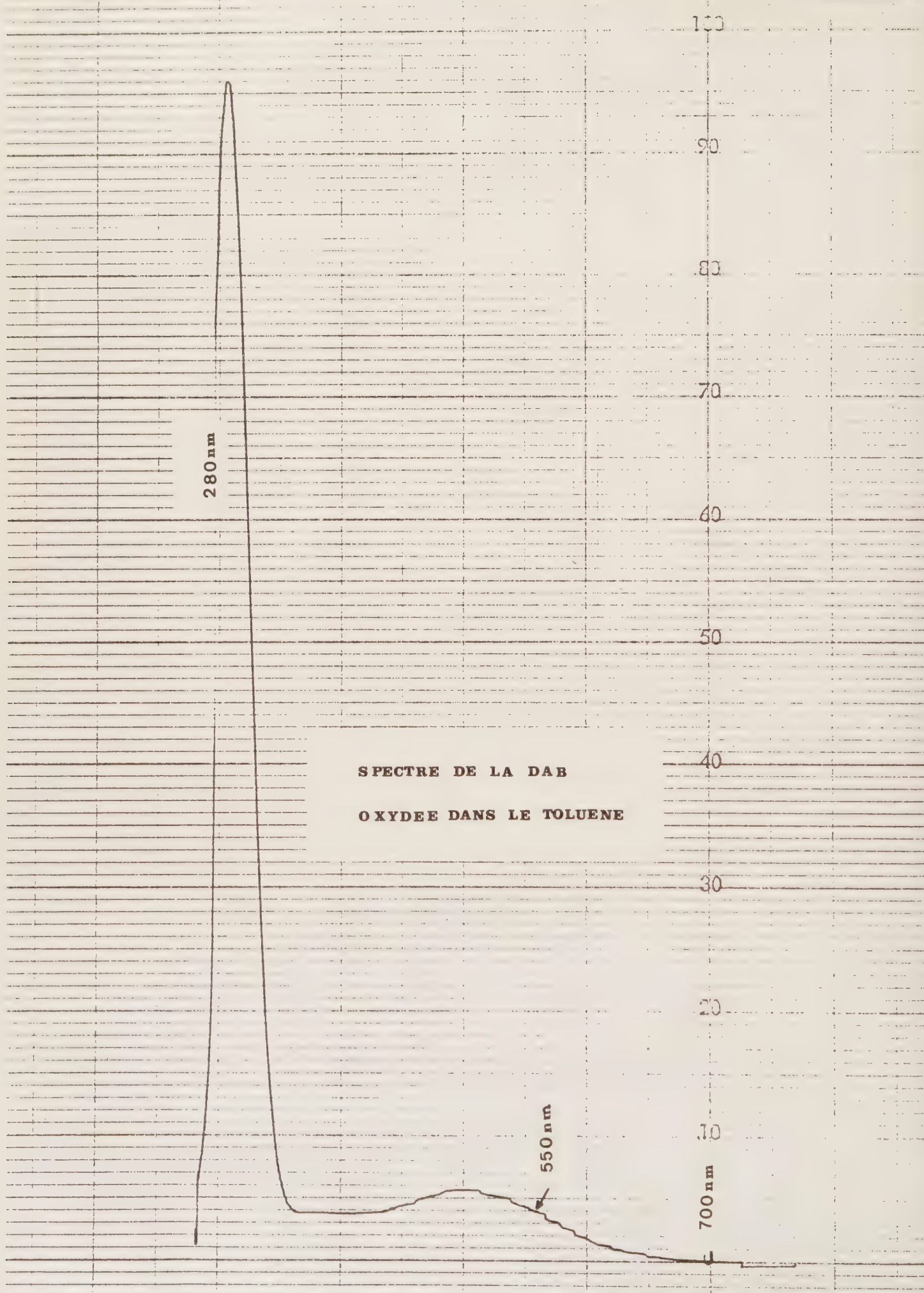


280 nm

700 nm

SPECTRE DE LA DAB
OXYDEE DANS L'EAU





SPECTRE DE LA DAB

OXYDEE DANS LE TOLUENE

Le spectre présente trois bandes d'absorption dont les maximums sont situés respectivement à :

500 - 495 nm
352 - 342 nm
et 292 nm

La diamino-3,3' benzidine oxydée est extraite par le toluène en milieu neutre ou légèrement alcalin. 1 ml de solution aqueuse de diamino-3,3' benzidine oxydée est complété à 30 ml avec de l'eau distillée et extrait avec 3 ml de toluène.

Le tracé du spectre s'effectue, là aussi, entre 700 et 280 nm (cuves de 1 cm - E₂). Une bande d'absorption large est observée et elle présente un maximum situé entre 515 et 495 nm.

L'absorbance à 550 nm est de 0,045.

En présence de nitrites et de traces d'autres oxydants (H₂O₂, NaOCl), l'absorbance à 549 nm est encore plus importante.

En conclusion, la diamino-3,3' benzidine oxydée peut être extraite avec le toluène en même temps que le complexe S_e⁻ - diamino-3,3' benzidine. Il en résulte le phénomène de quenching par transfert d'énergie électronique, ceci est observé chaque fois que l'absorption d'un dérivé en solution a lieu à la longueur d'onde d'émission d'un autre.

2.8.2. - Cas du diamino-2,3 naphthalène :

Nous avons observé le même phénomène avec le diamino-2,3 naphthalène. Là aussi, une durée de chauffage de 30 minutes est nécessaire pour un rendement optimal.

Vu la bonne reproductibilité de la méthode, nous avons réalisé l'étude sur deux prises d'essai de 2 ml d'urine seulement, et sans addition de sélénium :

	t = 0	t = 15	t = 30	t = 60
1	3,5	18,5	22	23
2	6,5	16,5	21	20

Le 100 % a été fait sur 100 ng et la lecture de la teneur (en µg/litre) se fait directement.

2.9. RENDEMENT DE LA METHODE -

2.9.1. - Sélénite de sodium :

Nous avons effectué ces essais en surchargeant 2 ml d'urine d'une quantité connue de sélénium (0,5 μ g sous forme de sélénite de sodium).

Les résultats sont les suivants :

	TEMOINS (0,5 μ g de sélénium)	URINES (2 ml)	URINES 2 ml + 0,5 μ g de sélénium
1	59	2,8	58
2	52	1,2	58
3	53	3,2	57
4	58	0,5	52
5	53	1,0	57
6	56	0,8	58
Moyenne..	55,17	1,58	56,67

- N.B. : Les résultats sont exprimés en unités fluorimétriques.

Le rendement de la méthode est très satisfaisant : 99,85 %. Aucune perte, soit par entraînement, soit par volatilisation du sélénium, n'est observée lorsqu'il s'agit du sélénium minéral à l'état de sélénite (Se IV).

2.9.2. - Métabolites organiques :

L'essai a été effectué sur les urines de rats adultes intoxiqués chroniquement pendant 1 mois par l'eau de boisson supplémentée par du sélénite de sodium (1 ppm en sélénium).

La prise d'essai est de 0,5 ml d'urine. Trois échantillons ont été minéralisés suivant la méthode déjà décrite ; deux autres, servant de témoins, ont été minéralisés par le même mélange, mais en vase clos, en utilisant une bombe en Téflon portée au four à moufle à 120-130°C pendant 1 h. 30. Au bout de ce temps, la minéralisation est complète et la solution est incolore. Le contenu de chaque bombe, après le refroidissement, est transvasé dans un micro-Kjeldahl, et l'acide nitrique est éliminé par distillation. Le reste perchlorique est chauffé pendant 30 minutes, le dosage final s'effectue avec le diamino-2,3 naphthalène.

Les résultats sont les suivants :

URINE 1	FLUORESCENCE	MOYENNE
Téf 1..	51	52,5
Téf 2..	54	
U 1....	48	48,75
U 2....	49,5	

Rendement = 92,3 %

URINE 2	FLUORESCENCE	MOYENNE
Téf 1..	46	46
Téf 2..	46	
U 1....	43	45,67
U 2....	45	
U 3....	49	

Rendement = 99,3 %

- N.B. : Les résultats sont exprimés en unités fluorimétriques.

Le 100 % de fluorescence a été réalisé sur le témoin renfermant 600 ng de sélénium, et le zéro sur un blanc. Par suite, les teneurs en sélénium des urines sont les suivantes :

Urine 1 : 630 µg/litre

Urine 2 : 552 µg/litre

Les résultats sont bons, et la méthode permet de doser la quasi totalité du sélénium dans les urines. La possibilité d'entraînement par distillation de l'acide nitrique est nulle, comme l'a déjà démontré le premier essai.

2.10. REPRODUCTIBILITE -

Nous avons étudié la reproductibilité de la méthode en fonction de différentes teneurs en sélénium.

2.10.1. - Cas de la diamino-3,3' benzidine :

L'étude a été réalisée sur une prise d'essai de 2 ml d'urine additionnée d'une quantité connue de sélénium sous forme de sélénite de sodium. Après minéralisation, réduction du séléniate et addition de tous les réactifs, le dosage est effectué en utilisant la diamino-3,3' benzidine comme agent complexant du sélénium.

Pour chaque concentration en sélénium, les écarts-types absolus et relatifs sont calculés à partir des résultats de dosage de 6 échantillons (tableau p. 214).

En portant l'écart-type relatif en fonction de la teneur en sélénium dans l'échantillon, on obtient une droite qui répond à l'équation :

$$y = - 1,13 \ x + 7,78$$

2.10.2. - Cas du diamino-2,3 naphtalène :

Il a été impossible de réaliser l'étude sur une prise d'essai d'urine du fait de la présence du sélénium, même à l'état de traces. Comme nous allons le voir ultérieurement, lors de la détermination de la teneur moyenne normale en sélénium des urines, la plus faible valeur correspond à 2,6 µg/litre, c'est-à-dire à 5,2 ng dans 2 ml d'urine. Par suite, l'étude a été effectuée en l'absence d'urine. La "minéralisation" et le dosage ont été conduits comme précédemment.

Là aussi, l'écart-type relatif varie linéairement avec la teneur en sélénium de la prise d'essai. Mais pour des teneurs inférieures à 80 ng, la variation est plus rapide, ce qui signifie que l'erreur relative augmente plus rapidement aux très faibles teneurs (tableau p. 216).

Pour des teneurs comparables, la reproductibilité est largement supérieure à celle observée avec la diamino-3,3' benzidine, et cela pour les raisons suivantes :

- 1) Meilleure stabilité du diamino-2,3 naphtalène en solution aqueuse.
- 2) Extraction faite en milieu acide et moins de possibilités d'interférences avec les impuretés et le réactif lui-même extraits en milieu alcalin, comme dans le cas du diamino-2,3 phényl piasssélénol.

	2 ml d'URINE + 0,4 µg de sélénium	2 ml d'URINE + 1 µg de sélénium	2 ml d'URINE + 2 µg de sélénium	2 ml d'URINE + 3 µg de sélénium	2 ml d'URINE + 4 µg de sélénium
M	0,405	0,97	2,248	3,04	4,08
	0,39	1,0	2,216	3,28	4,08
	0,37	1,105	2,204	3,04	3,88
	0,375	1,05	1,928	3,288	4,24
S	0,46	0,95	2,208	3,20	4,12
	0,41	0,91	2,008	3,00	3,86
	0,401	0,997	2,135	3,073	4,043
	0,023	0,064	0,121	0,131	0,134
S %	7,42 %	6,47 %	5,68 %	4,28 %	3,311 %

Etude de la reproductibilité en fonction de la teneur en sélénium
(cas de la DAB)

VARIATION DE LA REPRODUCTIBILITE EN FONCTION DE
LA TENEUR EN SELENIUM (CAS DE LA DAB)

ECART TYPE RELATIF %

8 7 6 5 4 3 2 1 0

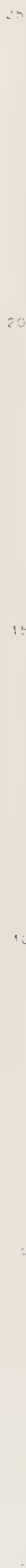
mcg de Se

4

3

2

1



	0,8 µg	0,4 µg	0,2 µg	0,08 µg	0,04 µg	0,02 µg
	0,79	0,415	0,21	0,083	0,039	0,018
	0,815	0,405	0,198	0,079	0,039	0,021
	0,81	0,395	0,20	0,078	0,043	0,0195
	0,82	0,395	0,20	0,0775	0,040	0,021
	0,80	0,400	0,20	0,080	0,036	0,022
	0,81	0,395	0,195	0,0825	0,041	0,020
M	0,807	0,401	0,20	0,800	0,0398	0,0202
s*	0,989	0,731	0,461	2,22	1,99	1,283
s %	1,22 %	1,824 %	2,23 %	2,627 %	5,018 %	6,33 %

Etude de la reproductibilité en fonction de la teneur en sélénium
(cas du DAN)

* Toutes les valeurs sont à multiplier par 10⁻².

VARIATION DE LA REPRODUCTIBILITE EN FONCTION
DE LA TENEUR EN SELENIUM (CAS DU DAN)

ECART TYPE RELATIF %

7

6

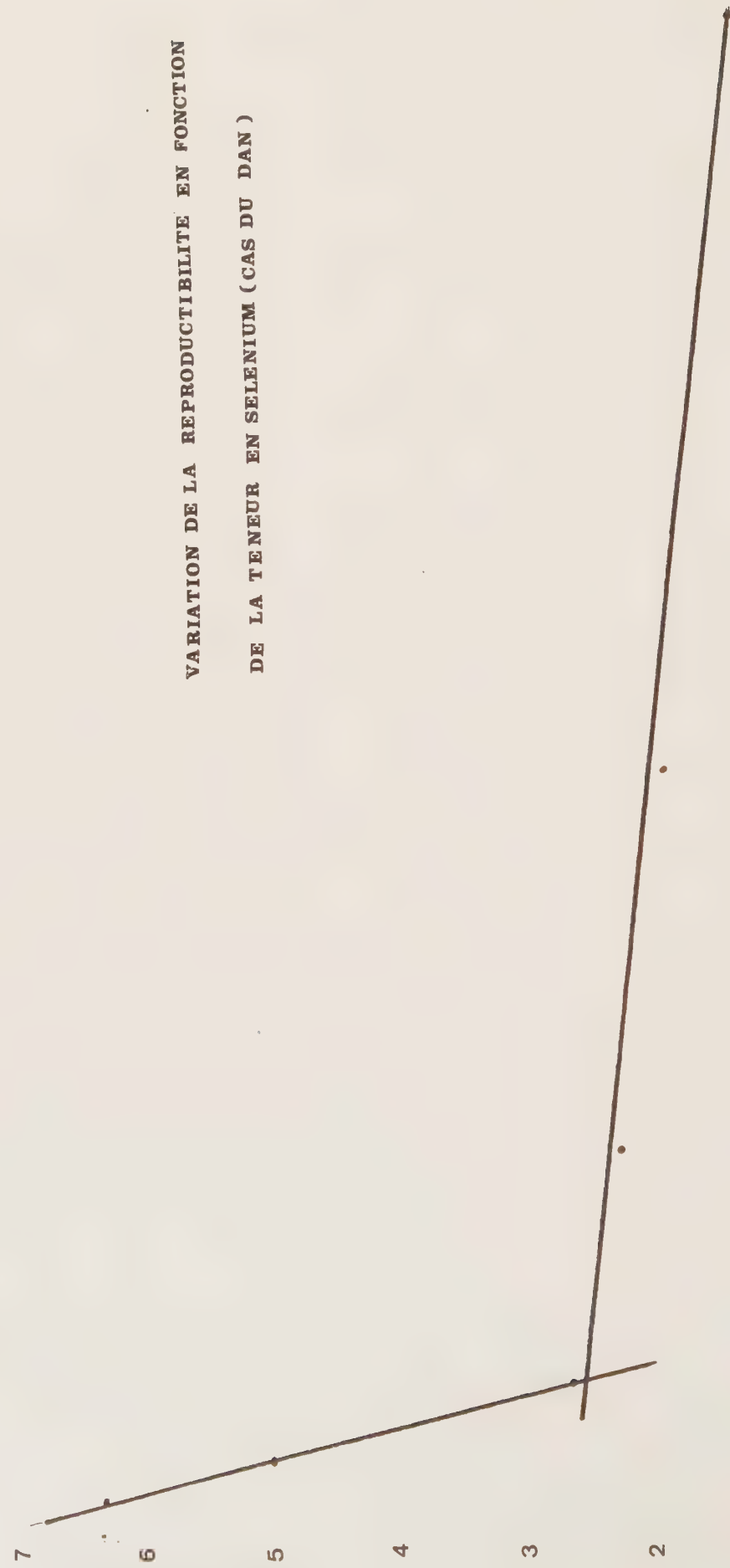
5

4

3

2

1



A la page 219, nous avons un exemple de la bonne reproductibilité de la méthode utilisant le diamino-2,3 naphthalène. Il s'agit de trois prises d'essai de 2 ml d'urine chacune. Les trois dosages successifs ont donné comme résultats :

52,6 ng, 52,0 ng et 48 ng de sélénium.

100

UN EXEMPLE DE LA BONNE REPRODUCTIBILITE
DE LA METHODE AU DAN: DOSAGE DU Se DANS
L'URINE (Prise d'essai de deux ml)

90

80

70

60

50

40

30

20

10

0

48 ng

52 ng

52,6 ng

3. DOSAGE SPECTROFLUORIMETRIQUE

3.1. INTRODUCTION -

En vue d'augmenter la sensibilité, d'améliorer la limite de détection et la spécificité de la méthode, nous avons envisagé la possibilité d'un dosage spectrofluorimétrique du sélénium. Comme nous l'avons déjà mentionné, deux réactifs ont été utilisés dans ce but : l'un, la diamino-3,3' benzidine, l'autre, le diamino-2,3 naphthalène. Ce dernier a été retenu comme méthode officielle pour le dosage du sélénium dans les plantes aux Etats-Unis.

Les conditions opératoires relatives à l'un ou l'autre de ces réactifs varient énormément d'un auteur à un autre. Une étude détaillée nous a semblé utile et nécessaire. Cette étude a été réalisée simultanément avec la mise au point de la méthode de minéralisation.

3.2. LA DIAMINO-3,3' BENZIDINE -

3.2.1. - Conditions opératoires :

3.2.1.1. Tracés des spectres d'excitation et d'émission de la diamino-3,3' benzidine dans l'eau et du complexe sélénium - diamino benzidine dans le toluène :

Les tracés de ces différents spectres auront un intérêt important lors de l'étude détaillée de la nature du complexe formé entre le sélénium et la diamino-3,3' benzidine et de l'étude des variations des longueurs d'onde d'excitation et d'émission en fonction de la concentration.

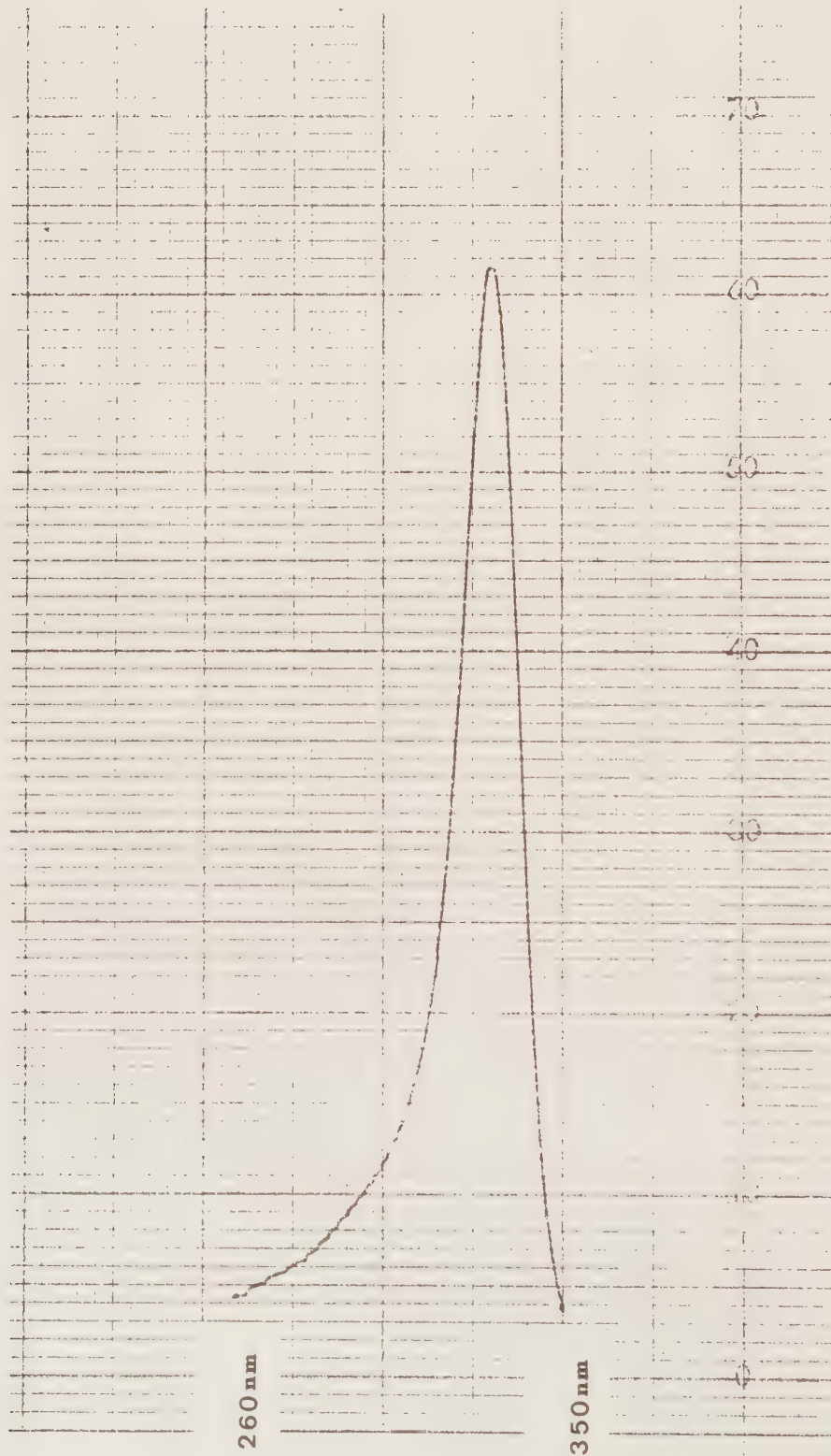
3.2.1.1.1. - TRACES DES SPECTRES DE LA DIAMINO-3,3' BENZIDINE :

Nous avons tracé les spectres d'excitation et d'émission d'une solution de diamino-3,3' benzidine à 1 mg/ml pour des longueurs d'onde comprises entre 350 et 260 nm et 350 à 550 nm, respectivement. Lorsqu'il s'agit du spectre d'émission, une deuxième bande, observée entre 650 et 850 nm (maximum entre 750 et 780 nm), correspond à la lumière diffusée par la cellule à une longueur d'onde double à celle de l'excitation.

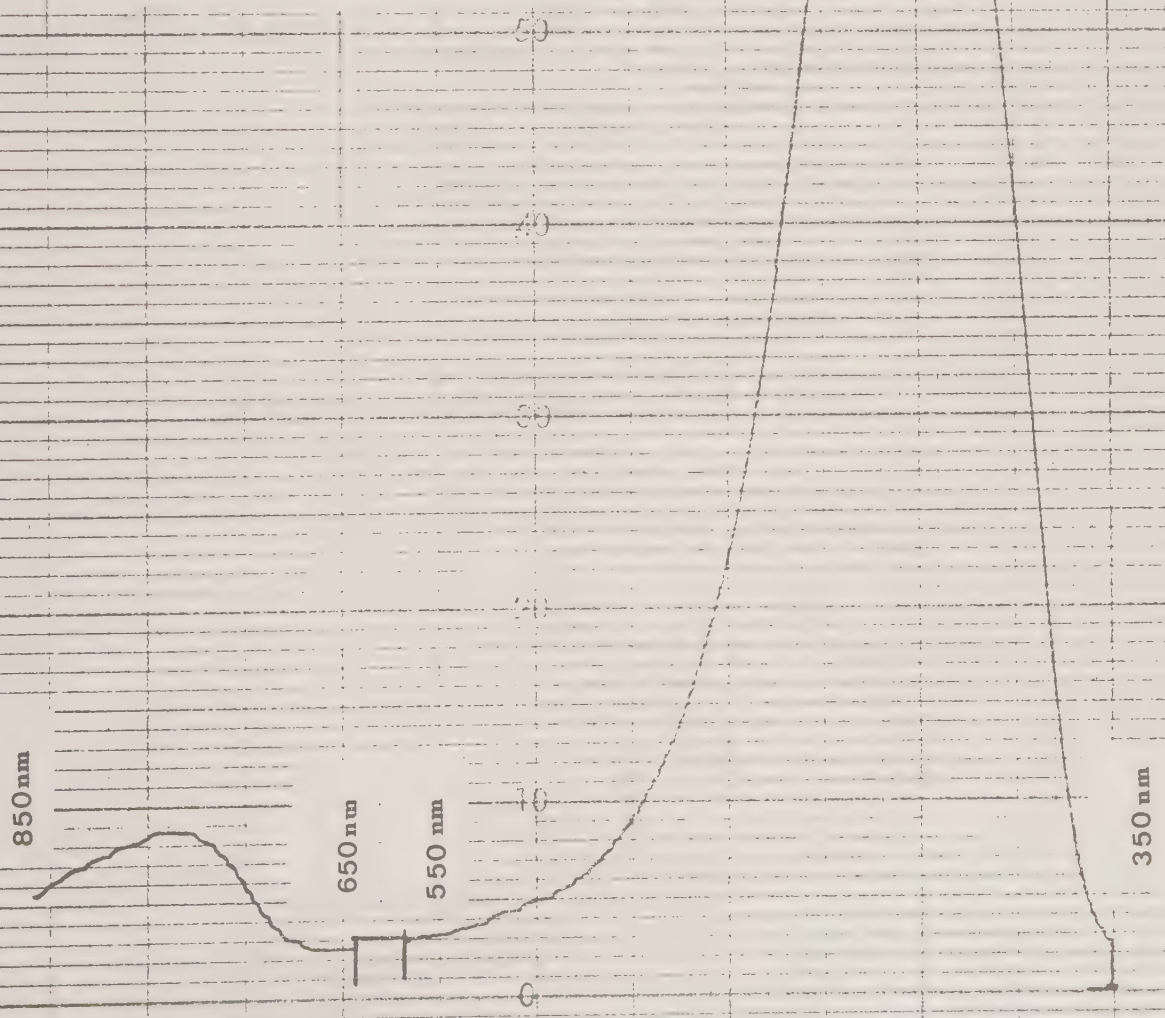
Les paramètres fixés sont les suivants :

Sensibilité.....	:	3 μ A
Fente.....	:	10 nm
Longueur d'onde d'excitation :		338 nm
Longueur d'onde d'émission..	:	415 nm

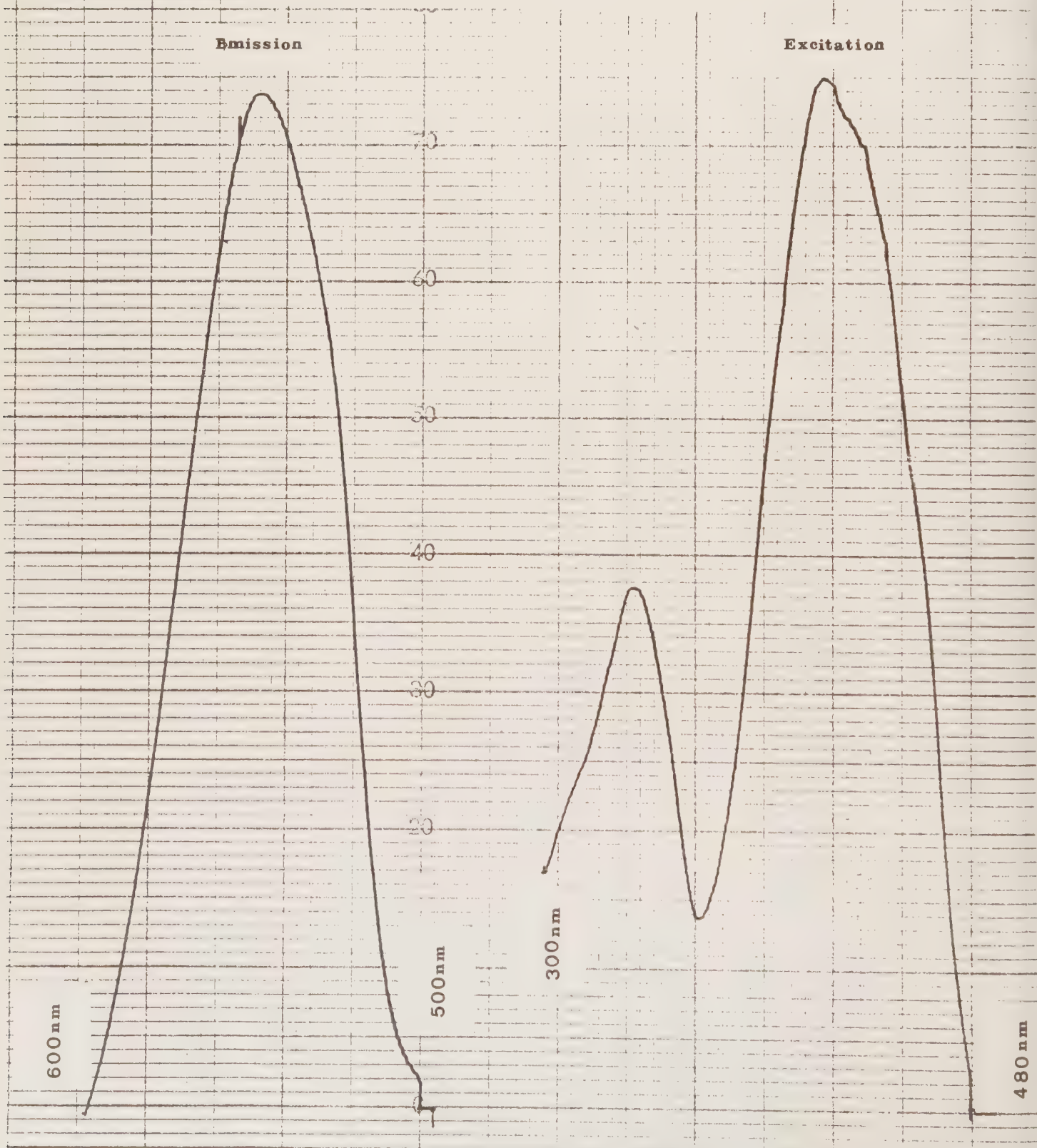
**SPECTRE D'EXCITATION DE LA
DAB DANS L'EAU**



**SPECTRE D'EMISSION DE LA
DAB DANS L'EAU**



SPECTRES D'EXCITATION ET D'EMISSION DE LA DAB-Se DANS LE TOLUENE



3.2.1.1.2. - TRACES DES SPECTRES DU COMPLEXE SELENIUM - DIAMINO BENZIDINE :

Il s'agit des spectres d'une solution contenant 4 µg de sélénium (sélénite de sodium), de volume final de 30 ml et extraite avec 3 ml de toluène. Le tracé du spectre d'excitation s'effectue entre les longueurs d'onde 480 et 300 nm, et celui d'émission entre 500 et 600 nm.

Les paramètres fixés sont les suivants :

Sensibilité..... : 0,1 µA
Fente..... : 10 nm
Longueur d'onde d'excitation : 423 et 340 nm
Longueur d'onde d'émission.. : 549 nm

Comme nous le remarquons, le spectre d'excitation de la molécule présente deux maximums : l'un à 423 nm et l'autre à 340 nm, alors que le spectre d'émission n'en présente qu'un seul.

Le maximum à 340 nm correspond à un passage de la molécule de l'état électronique fondamental S_0 à un état vibrationnel donné V_2 de l'état excité S_1^* , alors que le maximum à 420 nm correspond au passage de l'état électronique fondamental S_0 à un état vibrationnel différent V_1 de l'état excité S_1^* . La fluorescence ne peut avoir lieu que de l'état vibrationnel le plus bas de l'état singulet S_1^* à l'état fondamental. De l'énergie est perdue par passage de l'état V_2 à l'état V_1 par conversion interne, ceci explique la présence d'une seule bande d'émission à 549 nm.

En attendant de réaliser l'étude sur la stabilité de la fluorescence et le phénomène de photodécomposition, aux deux longueurs d'onde d'excitation respectivement, nous avons choisi la plus grande longueur d'onde pour effectuer nos dosages. Il s'agit d'une règle générale en spectrofluorimétrie. Le choix de cette longueur d'onde réduit toutes les possibilités de photodécomposition de la molécule provoquée par une énergie d'irradiation élevée.

3.2.1.2. Influence du pH sur le développement de la coloration :

pH	REFERENCES
2 - 3	(69, 82)
2,5	(336, 285)
2,0 - 2,4	(105)
2,0	(97)
Pourpre de métacrésol : virage à pH = 1,2 - 2,8	(413)

L'étude a été réalisée sur une prise d'essai de 6 µg de sélénium sous forme de sélénite de sodium (2 µg en cas de dosage fluorimétrique), en présence de 2,5 ml d'acide perchlorique, 2,5 ml d'acide chlorhydrique 1 N, 5 ml de solution de chlorhydrate d'hydroxylamine, et du sel disodique, de l'éthylène diamine tétracétique (2,5 g et 1 g, respectivement, pour 100 ml d'eau). Le pH a été amené à la valeur désirée avec de l'ammoniaque diluée au demi.

Après le développement de la coloration pendant 90 minutes à température ambiante, le pH a été amené à 7 et le volume final à 20 ml, et la coloration a été extraite avec 4 ml de toluène.

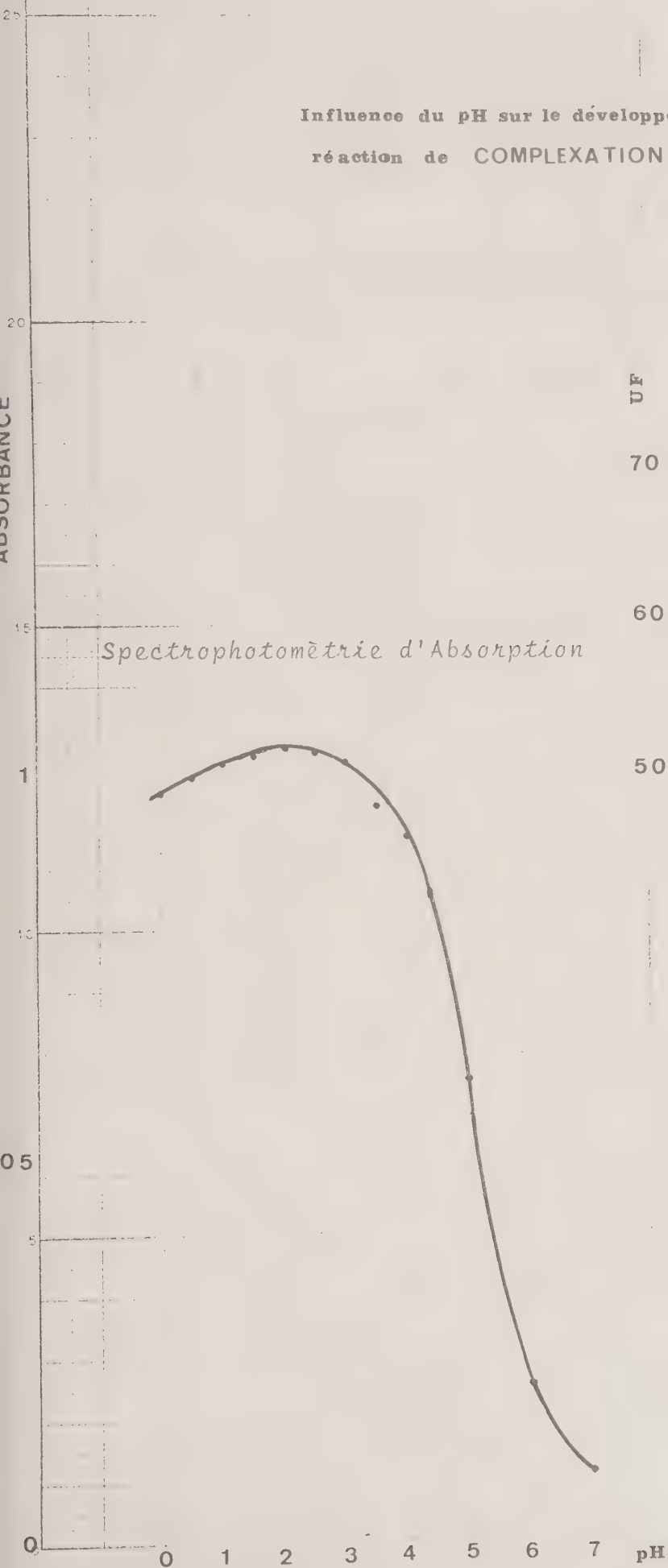
L'absorbance a été mesurée à 420 nm (cuves de 4 cm, E_f) et la fluorescence aux deux maximums d'excitation et d'émission.

Les valeurs observées sont résumées dans les deux tableaux suivants :

pH	ABSORBANCE	
	1	2
0	0,98	0,97
0,5	1,0	1,0
1,0	1,04	1,02
1,5	1,03	1,05
2,0	1,06	1,05
2,5	1,04	1,04
3,0	1,03	1,01
3,5	0,96	0,94
4,0	0,92	0,93
5,0	0,63	0,575
6,0	0,23	0,18
7,0	0,08	0,09

pH	FLUORESCENCE	
	1	2
1,0	62	64
1,5	66,5	65
2,0	67	68,5
2,5	65,5	63
3,0	60	60,5

Influence du pH sur le développement de la
réaction de COMPLEXATION.



UF

70

Spectrofluorimétrie

60

50

1 1,5 2 2,5 3 pH

Le pH, comme nous venons de le voir, a une influence importante sur le développement de la coloration. Une variation, bien que minime, peut entraîner des erreurs importantes lorsqu'il s'agit du dosage fluorimétrique. Malgré les précautions qui seront prises et qui rendront le dosage long et pénible, la reproductibilité de la méthode sera moins bonne que dans le cas du diamino-2,3 naphthalène ; d'autres facteurs interviendront aussi.

3.2.1.3. Effet de la température et de la concentration en acide chlorhydrique sur le développement de la coloration :

3.2.1.3.1. - LA TEMPERATURE :

Le développement de la coloration varie avec la température. A 100°C, comme il a été déjà démontré par ROQUEBERT (335), le développement est achevé en 5 minutes. Mais, au cours de nos travaux, nous avons remarqué qu'une prolongation de cette durée de 2 à 3 minutes entraîne la décomposition du réactif et l'apparition d'une coloration rouge brunâtre. Cette coloration est aussi observée lorsque la solution est gardée à l'air libre pendant 24 heures ou en présence d'acide nitreux et d'autres oxydants.

La diamino benzidine est instable en solution et sa dégradation est accélérée par la chaleur. A 100°C, au cours du développement de la coloration, la dégradation thermique, bien que passant inaperçue en colorimétrie, entraîne l'apparition de dérivés capables d'interférer en spectrofluorimétrie, se traduisant par une baisse significative de l'intensité de fluorescence. Le test t appliqué à la comparaison des deux moyennes de deux échantillons de 6 essais chacun, dont le développement de la coloration s'effectue respectivement à température ambiante et au bain-marie bouillant, est significatif pour un seuil de sécurité de 0,05 ($t = 2,29$).

La mesure de la fluorescence a été réalisée sur des solutions renfermant 0,8 µg de sélénium, de volume final de 30 ml, extraites avec 3 ml de toluène. Les résultats observés sont les suivants :

	1	2	3	4	5	6	MOYENNE ET ECART-TYPE
Développement de la coloration à 100°C	77	75	79	72,5	68,5	70	73,67 s = 3,7
Développement de la coloration à température ambiante	87,5	73	79	83,5	80	76	79,83 s = 4,7

- N.B. : Les résultats sont exprimés en unités fluorimétriques.

Le passage de la température ambiante à 50°C ne réduit que d'une manière très faible la durée nécessaire au développement de la coloration. Les essais réalisés sur une prise d'essai de 1 µg de sélénium (sélénite de sodium/eau distillée), en l'absence d'acide chlorhydrique, montrent les résultats suivants :

Durée en minutes	5	10	20	30	40	50
Développement à 50°C	61	67	69	69,5	70	-
Développement à température ambiante	46	64	70	69	70	71

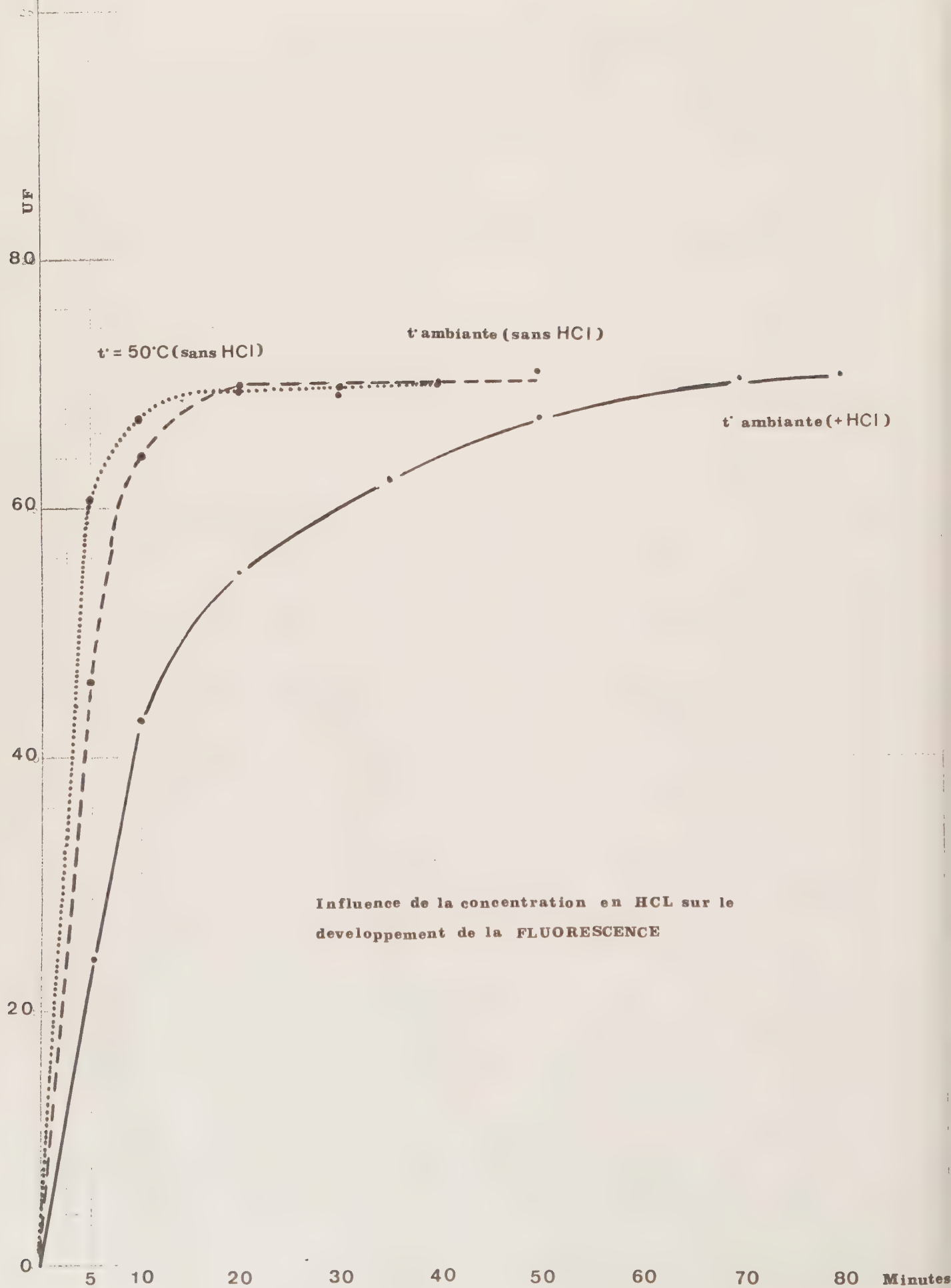
- N.B. : Les résultats sont exprimés en unités fluorimétriques.

Face à ces résultats, nous avons préféré la réalisation du développement de la coloration à la température ambiante.

3.2.1.3.2. - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ACIDE CHLORHYDRIQUE :

Lorsque nous avons effectué le dosage du sélénium par minéralisation avec le mélange acide perchlorique - sulfomolybdate, il nous est apparu que le développement total de la coloration avait lieu dans les 20 minutes qui suivent l'addition de la diamino-3,3' benzidine. Cependant, lorsque la minéralisation a été réalisée avec le mélange nitro-perchlorique suivi de l'addition d'acide chlorhydrique pour la réduction du sélénium (éventuellement oxydé à l'état de séléniate) en sélénite, le développement était incomplet 20 minutes après. Ceci nous a amené à penser à la possibilité de perte du sélénium au cours de la minéralisation. Cependant, lors de l'étude du pourcentage d'oxydation de sélénite en séléniate après minéralisation avec le mélange nitro-perchlorique, nous avons été surpris de trouver avec du sélénite (et en l'absence d'acide chlorhydrique) une intensité de fluorescence supérieure à celle correspondant à la prise d'essai qui a subi une réduction par l'acide chlorhydrique après minéralisation. L'intensité de la fluorescence était aussi voisine de celle obtenue avec le mélange acide perchlorique - sulfomolybdate.

La variation négative de la fluorescence ne peut être attribuée à une perte en sélénium par volatilisation ou par entraînement au cours de la minéralisation, ou à une perte



par formation de dérivés volatils par réduction chlorhydrique, pour les raisons suivantes :

- l'acide chlorhydrique, à la concentration utilisée, n'entraîne pas de perte en sélénium, comme nous l'avons démontré ;
- le rendement de la méthode, comme on vient de le démontrer, est supérieur à 99 %.

Le seul paramètre qui varie étant la présence d'acide chlorhydrique, nous avons étudié son influence sur le développement de la coloration en réalisant l'essai suivant :

- L'essai est réalisé sur deux séries d'échantillons. Chaque échantillon renferme 1 µg de sélénium sous forme de sélénite de sodium. Une des deux séries ne reçoit pas d'acide chlorhydrique (2,5 ml à 1 N). Le développement de la coloration s'effectue à température ambiante, le dosage s'effectue en spectrofluorimétrie.

1) En l'absence d'acide chlorhydrique :

Temps en minutes.....	5	10	20	50
Intensité de la fluorescence.....	46	64	70	71

2) En présence d'acide chlorhydrique (2,5 ml d'HCL 1 N) :

Temps en minutes.....	5	10	20	50	70	80	90
Intensité de la fluorescence	24	43	55	67	70	70	69

La présence d'acide chlorhydrique prolonge le temps nécessaire au développement de la coloration, très probablement par la formation de chlorhydrate de diamino-3,3' benzi-dine.

3.2.1.4. Influence du pH sur le rendement de l'extraction :

L'étude de l'influence du pH sur le rendement de l'extraction en colorimétrie et sur l'intensité de la fluorescence a été réalisée sur deux séries d'échantillons. Chaque échantillon renfermait 6 µg de sélénium sous forme de sélénite de sodium (2 µg en cas de fluorimétrie), le volume final étant de 20 ml et extrait avec 4 ml de toluène.

Les résultats, observés à différentes valeurs de pH, sont groupés dans les deux tableaux ci-après :

pH	ABSORBANCE	
	1	2
5,0	0,97	0,98
5,5	0,99	0,985
6,0	1,00	1,005
6,5	1,00	1,005
7,0	1,010	1,005
7,5	1,015	1,020
8,0	1,025	1,040
8,5	1,020	1,005
9,0	0,97	0,98
10,0	0,97	0,95
11,0	0,96	0,97

pH	FLUORESCENCE	
	1	2
6,0	58	60
6,5	63	65,5
7,0	69	67,7
7,5	68	67
8,0	64,1	64
8,5	62	62,5
9,0	61	60,5
10,0	60	60,5
11,0	59	60,5

- DISCUSSION :

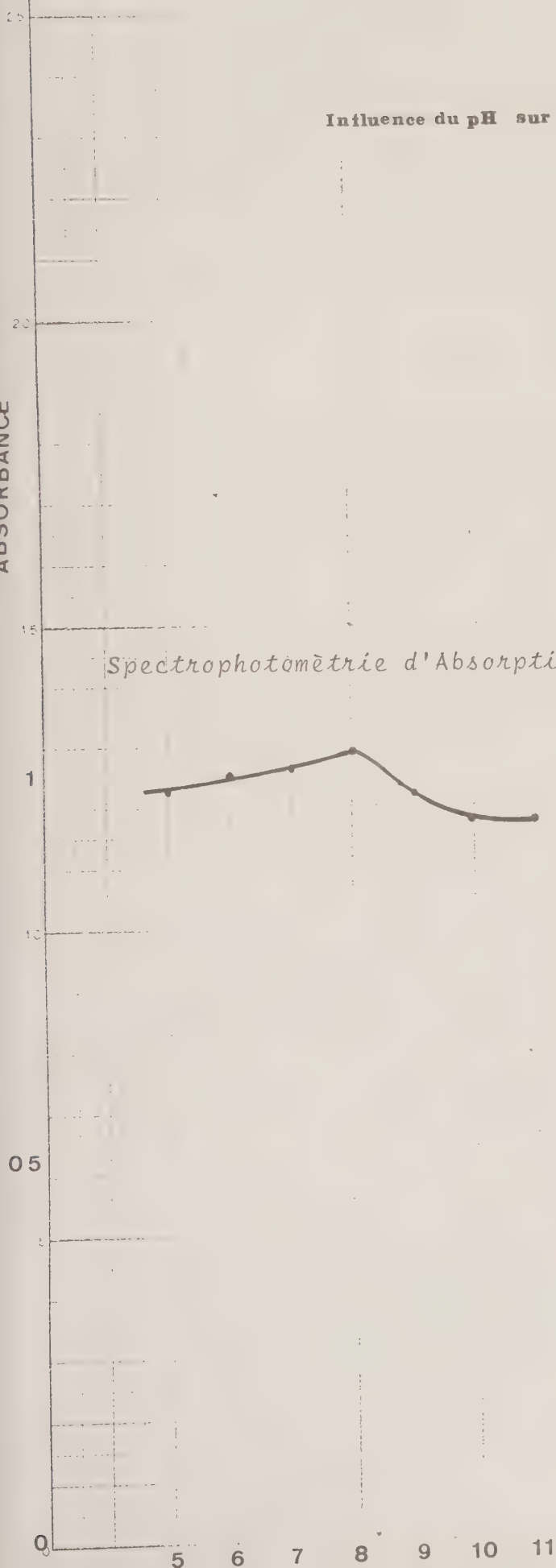
Le pH optimal correspondant au meilleur rendement d'extraction est égal à 8 lorsque le dosage s'effectue en spectrophotométrie visible. Cependant, lorsque nous effectuons le dosage en spectrofluorimétrie, nous remarquons que le pH optimal dévie à gauche, c'est-à-dire vers les valeurs les plus faibles :

- a) La baisse progressive du rendement observé en colorimétrie est due à une compétition entre, d'une part, le complexe coloré diamino benzidine - sélénium et, d'autre part, la diamino benzidine libre en solution, en milieu légèrement et fortement alcalin ($\text{pH} \geq 8$).
- b) En fluorimétrie, cette compétition ne peut avoir lieu qu'à partir du pH égal ou supérieur à 8 et, pourtant, la baisse de la fluorescence est observée lorsque le pH dépasse la valeur 7. Ceci ne peut être expliqué que par le fait que certaines impuretés, extraites en même temps que le complexe par le toluène, entraînent un effet quenching, appelé encore "Quenching impurities".

Influence du pH sur le rendement de L'EXTRACTION

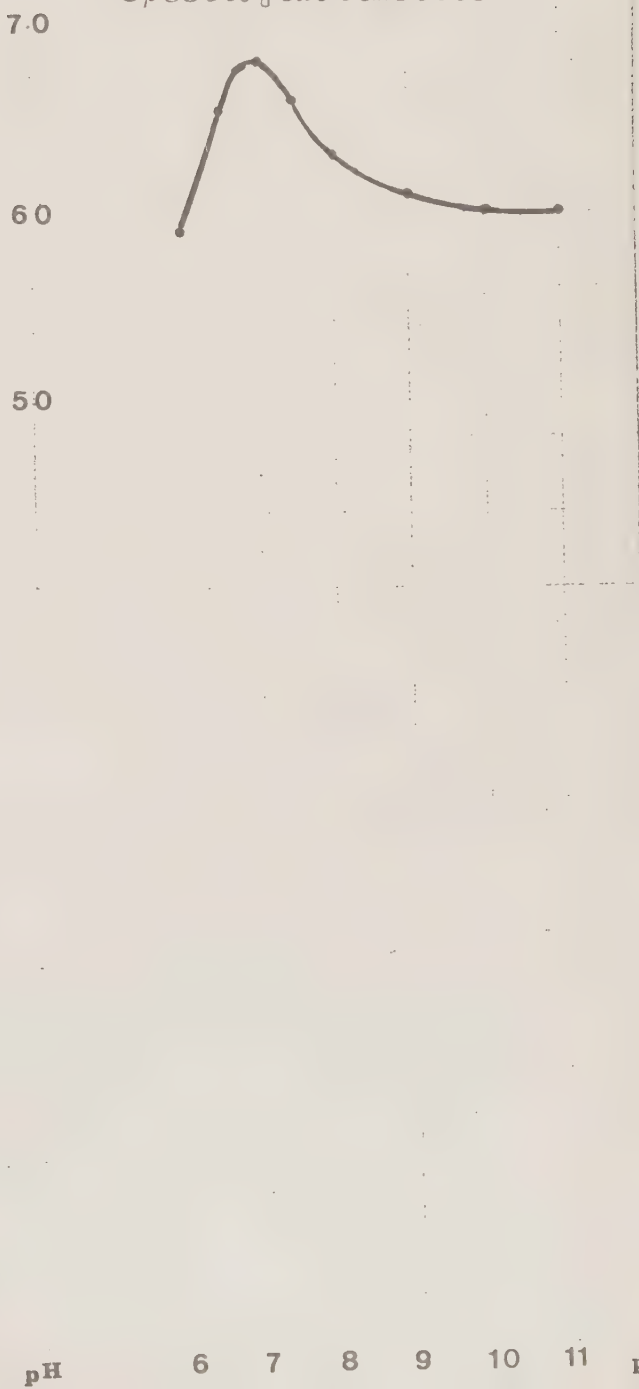
ABSORBANCE

Spectrophotométrie d'Absorption



U.F.

Spectrofluorimétrie



La perte en intensité s'effectue par relaxation non radiative par choc. Ce mode de quenching est le seul qui ne disparaît pas par dilution, à condition que la concentration en impuretés soit supérieure ou égale à celle du complexe. Pour vérifier cette hypothèse, 3 ml de l'extrait organique de chaque échantillon ont été prélevés et dilués avec 3 ml de toluène. La lecture de la fluorescence ne montre pas de déviation du maximum qui est toujours à pH = 7.

La réaction correspondant au phénomène de quenching est la suivante :



pH	ESSAI 1	ESSAI 2
6,0	30	28
6,9	33,5	36
7,0	37,5	38,5
7,5	37	35
8,0	33	32,5
8,5	31	32,5
9,0	30	28
10,0	28	29
11,0	29	27

- N.B. : Les résultats sont exprimés en unités fluorimétriques.

3.2.1.5. Stabilité et photodécomposition :

3.2.1.5.1. - COLORIMETRIE :

- STABILITE :

L'étude a été réalisée sur deux échantillons contenant chacun 6 µg de sélénium sous forme de sélénite de sodium. Le volume final était de 20 ml et extrait avec 4 ml de toluène. L'absorbance est lue toutes les 30 minutes pendant 3 heures. Pour éliminer autant que possible les erreurs, la cuve de 4 cm a été remplie complètement avec la phase organique et bouchée avec un papier parafilm pour éviter la volatilisation.

Une des deux cuves a été maintenue à la lumière du jour, l'autre à l'obscurité.

Les résultats observés sont groupés dans le tableau suivant :

DUREE en minutes	ABSORBANCE	
	Obscurité	Lumière
0	0,465	0,465
30	0,465	0,473
60	0,468	0,470
90	0,475	0,477
120	0,480	0,482
180	0,484	0,510

- CONCLUSION :

La stabilité, aussi bien à l'obscurité qu'à la lumière, n'est pas absolue, mais peut être considérée comme suffisante.

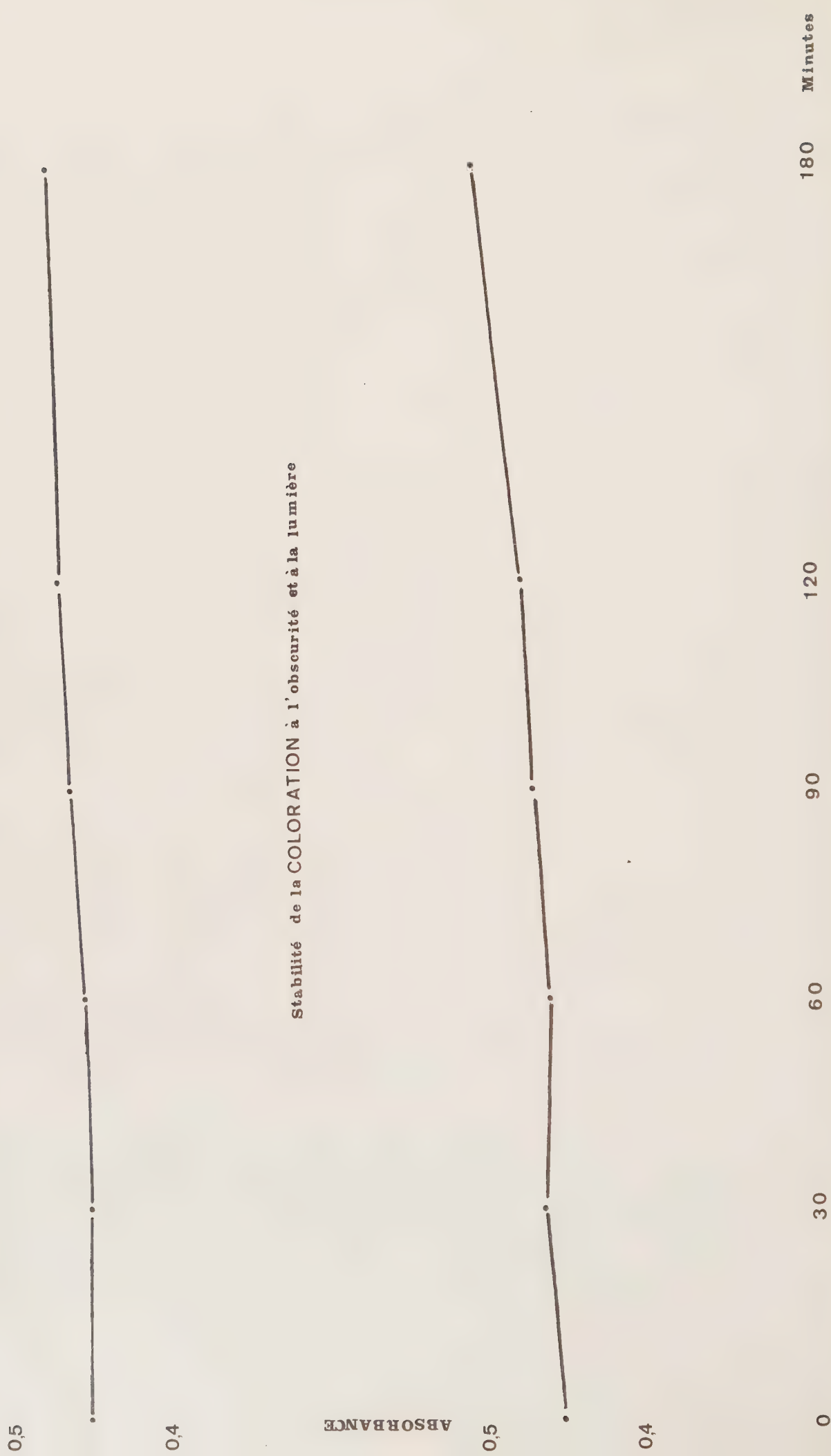
3.2.1.5.2. - SPECTROFLUORIMETRIE :

- PHOTODECOMPOSITION :

Un volume final de 40 ml renfermant 2 μ g de sélénium est extrait avec 25 ml de toluène. Deux prélèvements de 2 ml chacun ont été effectués pour étudier la photodécomposition, respectivement aux longueurs d'onde de 423 nm et 340 nm. Le reste a servi à étudier l'influence de la température sur la fluorescence.

La mesure de la fluorescence est effectuée par l'intermédiaire d'un enregistreur couplé au fluorimètre et donnant, de manière continue et régulière, la variation de la fluorescence en fonction du temps. Les résultats sont les suivants (voir tableau p. 235).

Dans les deux cas, la fluorescence est relativement stable les deux premières minutes. La stabilité à 340 nm est encore meilleure, cependant l'intensité est plus faible à cette longueur ; pour cette raison, il nous est apparu préférable de travailler à 420 nm.



DUREE en minutes	FLUORESCENCE à 340 nm	FLUORESCENCE à 423 nm
0	15,38	20,38
1	15,00	20,38
2	15,00	20,77
3	14,04	21,15
4	14,23	21,92
5	14,49	22,30
6	14,62	22,70
7	14,62	23,07
8	14,81	23,46
9	14,81	23,84
10	15,00	24,23
11	15,00	24,61
12	15,19	24,80
13	15,38	25,00
14	15,58	25,38
15	15,76	25,57
16	15,96	25,77
17	15,76	26,15
18	16,15	26,54
19	16,15	26,54
20	16,53	26,92

Photodécomposition du diamino-phényl-piazsélénol
dans le toluène

- STABILITE :

Cet essai a été réalisé sur deux échantillons renfermant chacun 0,1 µg de sélénium. Le volume final est de 30 ml et est extrait avec 3 ml de toluène. Les deux cuves en quartz de 1 cm d'épaisseur ont été remplies de l'extrait et bouchées avec un papier parafilm. Une des deux cuves est maintenue à l'obscurité, l'autre à la lumière du jour. La mesure de la fluorescence se fait toutes les dix minutes (voir tableau ci-dessous et courbes p. 238 et 239).

DUREE en minutes	OBSCURITE	LUMIERE
0	86	87,5
10	86	88
20	89	87,5
30	91	88
40	93	86
50	94,5	86
60	97,5	86
70	98	86
80	99	86
90	100,5	85,5
100	101,5	84,5
110	102	84
120	103	83,5

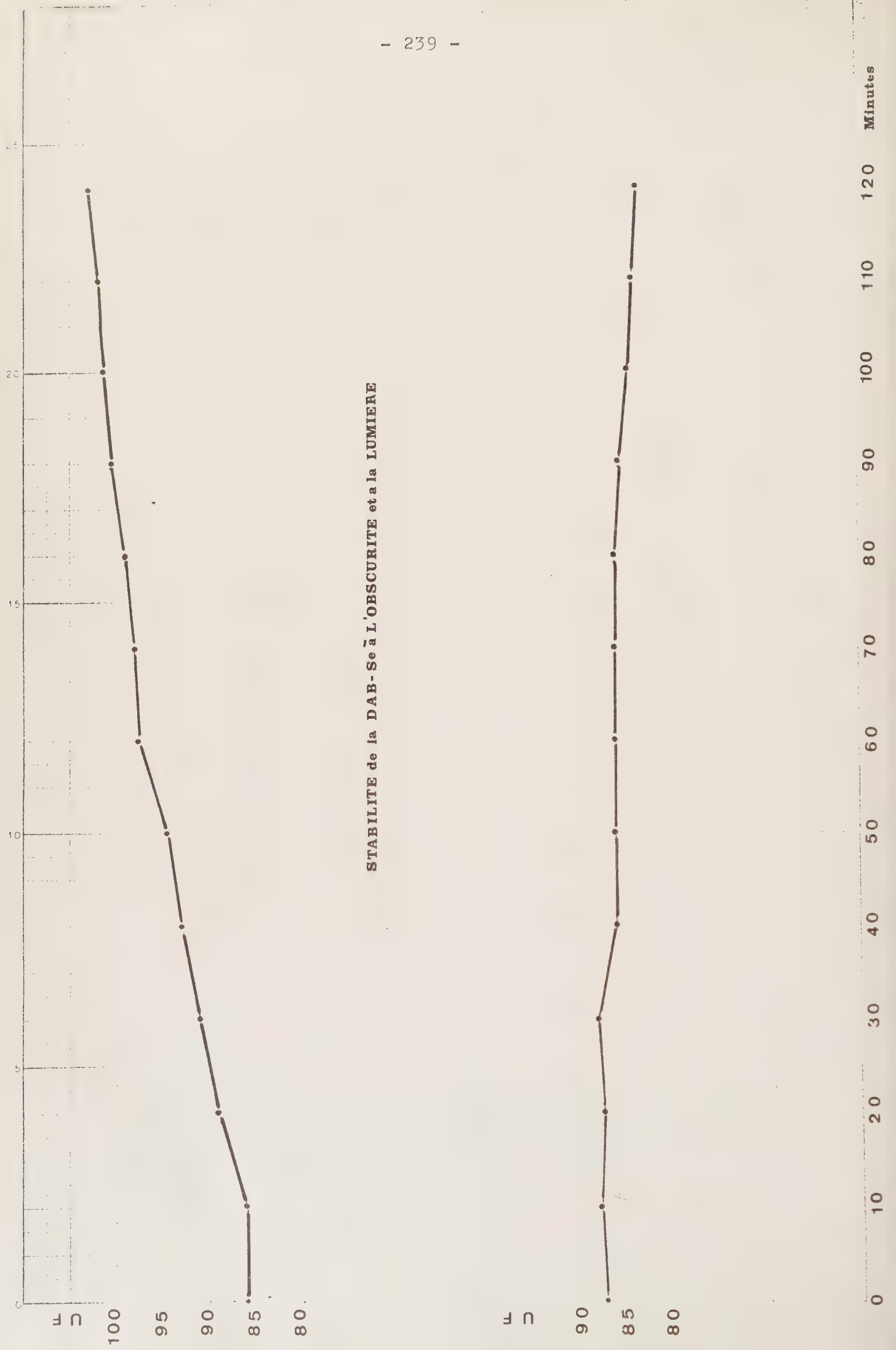
- N.B. : Les résultats sont exprimés en unités fluorimétriques.

La stabilité de la fluorescence est largement supérieure à la lumière du jour qu'à l'obscurité. En effet, à l'obscurité, nous observons une augmentation régulière et continue de l'intensité de fluorescence à partir de la dixième minute.

PHOTODECOMPOSITION de la DAB-Se



STABILITE de la DAB-Se à L'OBSCURITE et a la LUMIERE

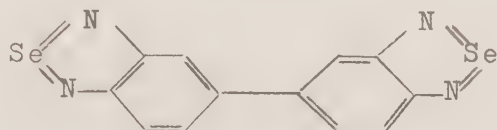


3.2.1.6. Effets de la température
et de l'oxygène dissous en solution :

L'influence de la température et de l'oxygène sur la fluorescence du diamino-2,3 phényl piazsélénol sera vue ultérieurement, lors de l'étude de l'incidence de ces deux facteurs sur la fluorescence du phényl piazsélénol.

3.2.2. - Nature du complexe formé entre le sélénium
et la diamino-3,3' benzidine :

Le complexe sélénium - diamino-3,3' benzidine défini par un grand nombre d'auteurs comme étant un di-piazsélénol, c'est-à-dire un dérivé disélénié, répond à la structure suivante :



Il se forme à un pH optimum voisin de 2 et est extractible par le toluène. Cependant, à notre avis, il ne peut répondre à la formule décrite ci-dessus pour les raisons suivantes :

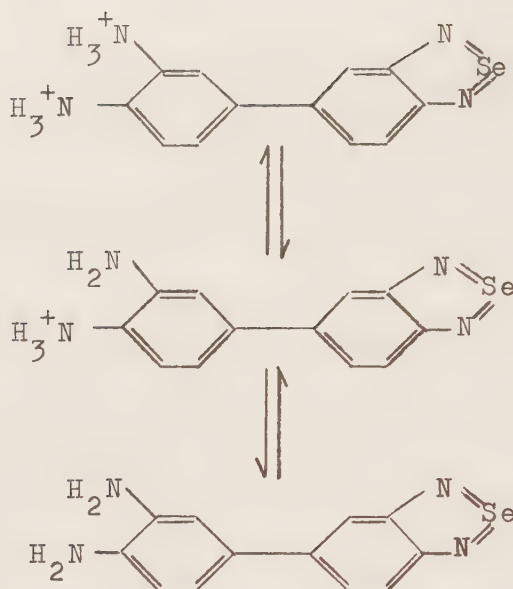
3.2.2.1. Extraction en milieux neutre et alcalin :

L'extraction, qui ne peut se faire qu'en milieu neutre ou alcalin, prouve la présence de groupements aminés libres sur la molécule, qui sont protonnés en milieu acide et confèrent, de ce fait, une charge totale positive au complexe, l'empêchant de traverser la barrière de potentiel qui sépare les deux phases organique et aqueuse. Il est à rappeler que seules les molécules de charge globale neutre peuvent traverser cette barrière et passer dans le toluène.

Au fur et à mesure que le pH augmente, l'équilibre (voir schéma p. 241), dévié à gauche en milieu fortement acide, va tendre à droite : la proportion de la forme neutre va augmenter progressivement pour atteindre son maximum à pH = 8 et au-delà de ce pH.

Comment expliquer la baisse de fluorescence ? A partir de pH = 8, il n'y a aucune raison pour que le rendement de l'extraction baisse de nouveau puisque la molécule ne porte pas de groupements ionisables en milieu alcalin.

La seule explication que nous pouvons donner est qu'en milieu alcalin il y a compétition entre les molécules du complexe sélénium - diamino benzidine et les molécules de diamino-3,3' benzidine neutres, ce qui va entraîner une légère diminution du rendement.



3.2.2.2. Variations observées au niveau du spectre du complexe DAB-Se en fonction du pH :

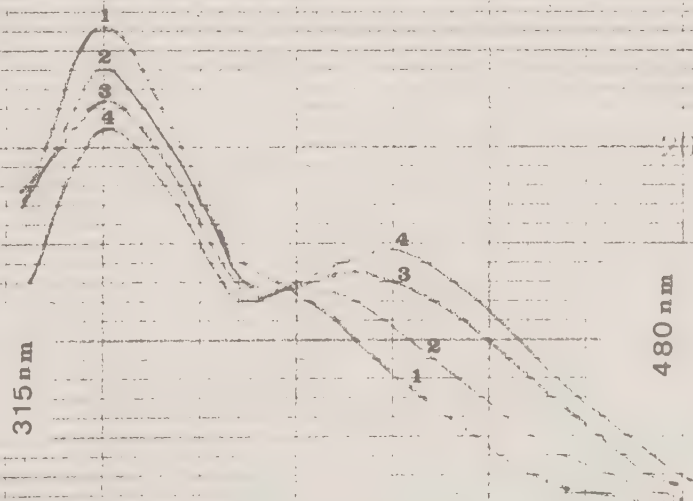
L'essai a été réalisé de la manière suivante : une prise d'essai renfermant 100 μg de sélénium sous forme de sélénite de sodium (50 ml à raison de 2 μg de sélénium par millilitre) a été amenée à pH 2 et additionnée de 10 ml de solution à 0,5 % de diamino-3,3' benzidine. On laisse la coloration se développer pendant 1 h. 30 ; on amène ensuite le pH à 7 et on extrait avec 10 ml de toluène à deux reprises. Les deux extraits organiques sont réunis et purifiés par agitation avec 50 ml de solution pure aqueuse à pH 2. Le complexe est de nouveau extrait avec 10 ml de toluène après avoir amené la phase aqueuse à pH 7, puis réextrait avec 25 ml d'eau à pH acide (2).

5 ml de la solution aqueuse ont été additionnés successivement à :

- . 15 ml de solution d'acide chlorhydrique 0,1 N,
- . 15 ml de solution tampon de phtalate acide de potassium 0,05 M (pH 4,008) (10,12 g/litre),
- . 15 ml de solution tampon composée de phosphate acide de potassium 0,025 M et de phosphate disodique 0,025 M (3,39 g et 3,53 g par litre, respectivement), pH = 6,864,
- . 15 ml de solution de borax $\text{Na}_4\text{B}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ à 0,01 M (3,8 g/litre) à pH 9,18.

Nous avons tracé ensuite le spectre de chaque solution entre 480 et 315 nm, en remplissant à chaque fois la cuve témoin avec le mélange tampon correspondant.

VARIATION DU SPECTRE EN FONCTION DU pH



- RESULTATS :

En milieu neutre ou alcalin, c'est-à-dire à $\text{pH} \geq 7$, la molécule présente en solution aqueuse deux maximums d'absorption : l'un à 411 nm correspondant à la transition $n - \pi^*$ (bande radicalaire) et l'autre à 340 nm correspondant à la transition $\pi - \pi^*$ (bande benzénoïde).

En milieu acide, au fur et à mesure que le pH diminue, l'absorption à 411 nm décroît progressivement pour disparaître à un pH voisin de 1. En même temps, le maximum d'absorption dévie légèrement vers les faibles longueurs d'onde.

Parallèlement, l'intensité de la bande B augmente légèrement, mais le maximum d'absorption demeure stable.

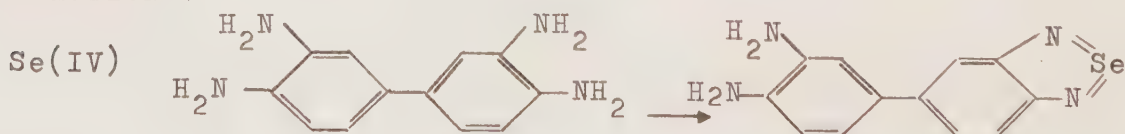
Explications :

- 1) En milieu alcalin, comme dans le cas des phénolates, les interactions entre le doublet d'électrons libres sur l'azote et les électrons π du noyau piazsélénol provoquent un effet hyperchrome ($\epsilon \text{ Max.} \uparrow$) et un effet bathochrome sur $\lambda \text{ Max.}$
- 2) En principe, lorsqu'on passe en milieu acide, les groupements aminés NH_2 sont protonnés et donnent NH_3^+ , et l'effet bathochrome de ces groupements auxochromiques sur la bande B va disparaître. Par suite, on doit observer une diminution d' $\epsilon \text{ Max.}$ et une déviation de la longueur d'onde maximale vers les faibles valeurs. Mais cet effet est compensé par la présence du cycle piazsélénol. En passant en milieu acide, comme dans le cas de la pyridine, les interactions entre le doublet d'électrons libres de l'azote et les électrons π diminuent, et le passage $\pi - \pi^*$ devient plus facile. $\epsilon \text{ Max.}$ va doubler d'intensité et $\lambda \text{ Max.}$ dévie vers les grandes longueurs d'onde.

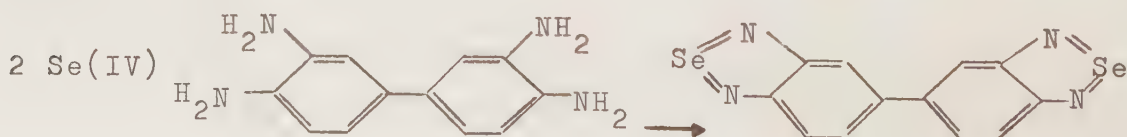
Le résultat final consiste en un déplacement minime de $\lambda \text{ Max.}$ et passe inaperçu. Par contre, l'effet hyperchrome l'emporte sur l'effet hypochrome, et il en résulte une augmentation modérée d' $\epsilon \text{ Max.}$

3.2.2.3. En présence d'un excès de réactif, c'est la réaction 2 qui est la plus probable : formation de diamino-2,3 phényl piazsélénol.

REACTION 1



REACTION 2



3.2.2.4. Dosage du sélénium dans le complexe
sélénium - diamino benzidine :

3.2.2.4.1. - SYNTHÈSE DU COMPLEXE :

La synthèse du complexe sélénium - diamino benzidine a été réalisée dans les conditions opératoires les plus proches possible de celles utilisées lors du dosage direct du sélénium. La prise d'essai de sélénium renferme 1 mg et la quantité de diamino-3,3' benzidine ajoutée est de 1 g dissous dans 50 ml d'eau. Cette solution a été ajoutée par petites quantités, tout en agitant, et le pH du mélange a été amené à 2. Après le développement de la coloration, la solution est amenée à pH 7 et extraite, à deux reprises, avec 25 ml de toluène.

Les deux extraits organiques sont réunis, et le complexe est réextrait par une phase aqueuse acide à pH 2. La phase acide est agitée 2 fois avec 25 ml de toluène après neutralisation à pH 7.

Les deux extraits sont réunis et évaporés sous vide à 50°C. Le produit est recueilli et la dessiccation est complétée dans un dessiccateur sous vide.

3.2.2.4.2. - DOSAGE DU SELENIUM :

10 mg du dérivé synthétisé ont été dissous dans 10 ml de toluène. Cette solution a été ensuite diluée au 1/10, et le dosage du sélénium dans le dérivé est effectué par minéralisation de 1 ml de cette solution avec le mélange nitro-perchlorique. Une gamme étalon a été préparée, renfermant 1 blanc et 4 témoins : 1, 2, 3 et 4 µg de sélénium, respectivement.

Les résultats obtenus sont les suivants :

TEMOINS	TENEUR en sélénium (µg)	FLUO- RESCENCE
1	0	93
2	1	35
3	2	58
4	3	80,5
5	4	100

DOSAGE	FLUO- RESCENCE	TENEUR CALCULEE en sélénium (µg)
1	76	2,8681
2	72	2,6912
3	74	2,779
4	72	2,6912
5	73,5	2,757
6	69,5	2,5805
Moyenne	72,83	2,7278

La moyenne des dosages donne pour la prise d'essai une teneur de 2,7278 μg de sélénium.

La valeur théorique est 2,7304 μg (27,304 % = 78,96/289,19), la valeur obtenue représente donc 99,905 % de la valeur théorique.

Ceci montre bien la présence d'un seul atome gramme de sélénium par molécule de dérivé obtenue.

3.2.2.5. Spectre infra-rouge de la molécule :

Le cinquième et dernier argument est le spectre infra-rouge de la molécule. Le pastillage a été réalisé avec du bromure de potassium.

La présence d'une fonction amine primaire libre est caractérisée dans le spectre par :

- la vibration d'allongement N-H. Les amines primaires donnent lieu à une vibration symétrique et une vibration antisymétrique qui se traduisent par deux bandes d'absorption au voisinage de 3.500 à 3.400 cm^{-1} . La présence de deux amines en position ortho sur le cycle benzénique rend ces deux fonctions susceptibles de former des liaisons hydrogènes (moins fortes que dans le cas d'une fonction hydroxyle) qui provoquent leur glissement vers les plus basses fréquences. Du fait de la possibilité de liaisons hydrogènes, les bandes sont larges, elles sont observées entre 3.200 et 3.400 cm^{-1} ;
- la vibration de déformation N-H est encore plus caractéristique. La bande est visible et est située à une fréquence supérieure à celle des groupements C-H, on l'observe à 1.625 cm^{-1} ;
- enfin, une vibration d'allongement C-N. Elle ne présente aucun intérêt puisqu'elle permet uniquement de distinguer une amine aromatique d'une amine aliphatique, elle est située à 1.310 cm^{-1} .

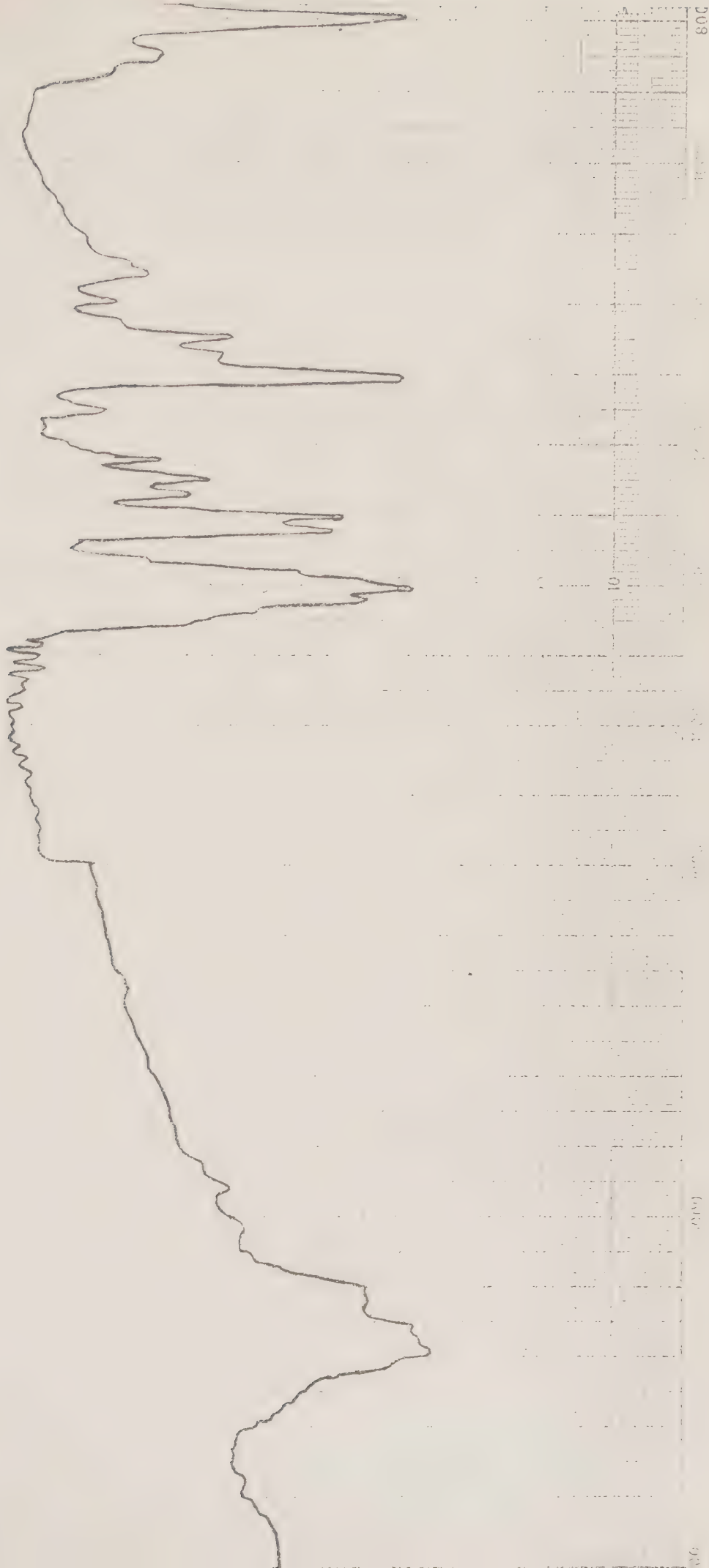
3.2.3. - Variation des longueurs d'onde

d'excitation et d'émission :

En faisant varier la concentration en sélénium de la prise d'essai, nous avons observé une déviation des longueurs d'onde maximales d'émission et d'excitation. En effet, les auteurs qui se sont servi de la diamino-3,3' benzidine pour le dosage fluorimétrique du sélénium ont tous donné des valeurs complètement différentes pour les maximums d'excitation et d'émission. L'usage d'un fluorimètre à réseau nous a permis de suivre facilement cette variation des longueurs d'onde qui n'a pas été observée jusque-là puisque la majorité des analystes se sont servi de fluorimètres équipés d'une lampe de mercure, dont les raies d'émission servaient de

SPECTRE INFRAROUGE de la DAB-Se.

- 246 -



sources d'excitation, et de filtres permettant de sélectionner la raie voulue. L'usage d'une lampe de Xénon à spectre continu et d'un monochromateur à réseau nous a permis de suivre et de décrire correctement ce phénomène.

3.2.3.1. Observations :

Plusieurs observations ont été faites.

- PREMIERE OBSERVATION :

Différentes prises d'essai renfermant 1, 2, 3 et 4 μg de sélénium, ont été analysées. Le volume final a été de 30 ml et extrait avec 3 ml de toluène.

A chaque concentration, correspondaient les longueurs d'onde d'excitation et d'émission suivantes :

QUANTITE DE SELENIUM PRESENTE DANS LA PRISE D'ESSAI	λ MAX. D'EXCITATION	λ MAX. D'EMISSION	CONCENTRATION APPARENTE DE SELENIUM DANS LE TOLUENE
1	411	519	0,33 $\mu\text{g/ml}$
2	414	523	0,67 $\mu\text{g/ml}$
3	421	544	1,0 $\mu\text{g/ml}$
4	423	549	1,33 $\mu\text{g/ml}$

- DEUXIEME OBSERVATION :

Une prise d'essai renfermant 5 μg de sélénium (5 ml à 1 μg de sélénium par millilitre) a été analysée de la même manière. Le volume final a été de 30 ml et extrait avec 3 ml de toluène.

2 ml de l'extrait final ont été prélevés. A cette concentration, et dans les conditions opératoires usuelles, correspondent un maximum de longueur d'onde d'excitation de 424 nm et un maximum de longueur d'onde d'émission de 553 nm.

Ces 2 ml ont été ensuite dilués au demi, c'est-à-dire additionnés de 2 ml de toluène pur. De nouveau, les longueurs d'onde d'émission et d'excitation ont été mesurées.

Deux dilutions successives au demi ont été réalisées et les maximums d'émission et d'excitation ont été mesurés. Les valeurs sont groupées dans le tableau suivant :

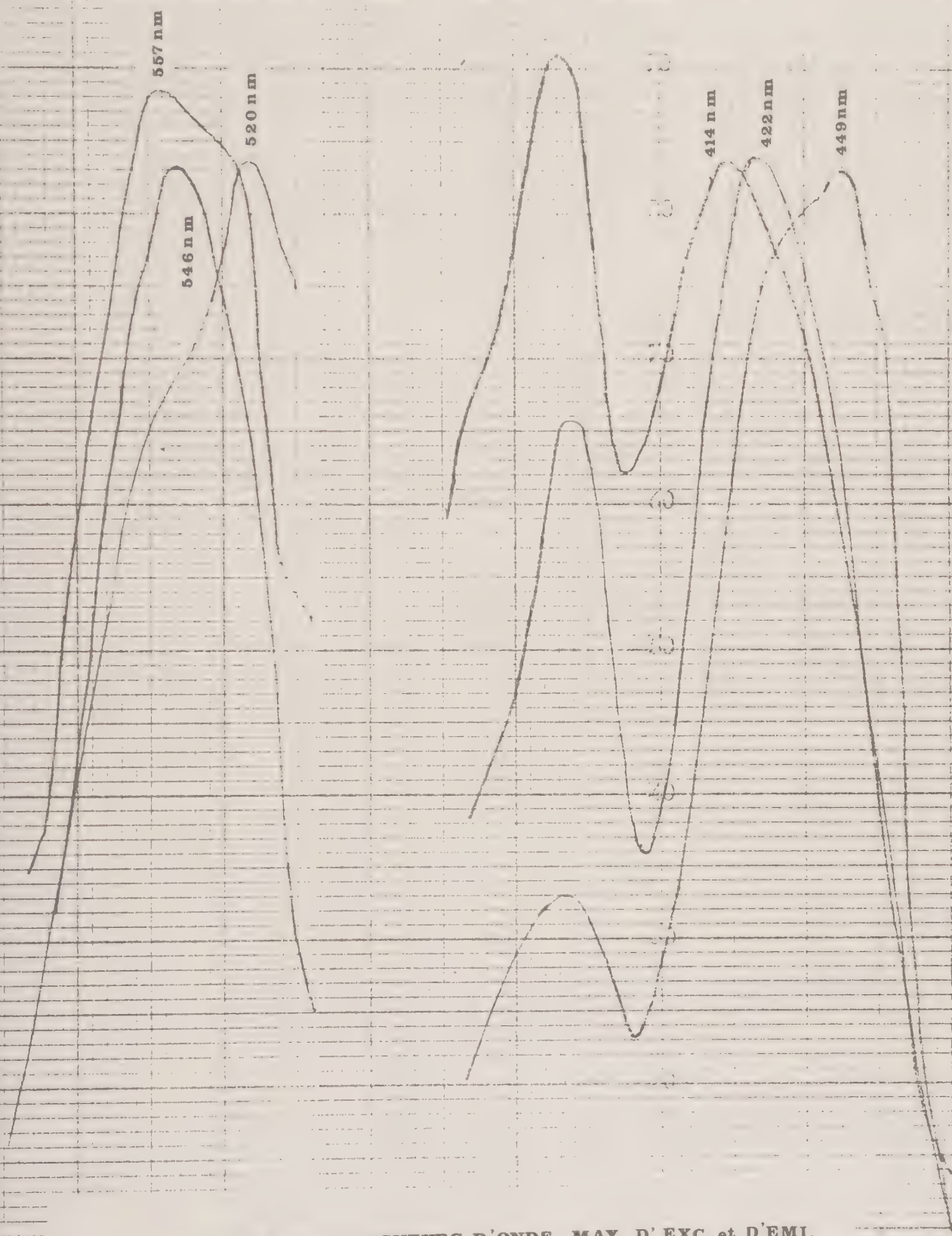
QUANTITE DE SELENIUM PRESENTE DANS LA PRISE D'ESSAI	λ MAX. D'EXCITATION	λ MAX. D'EMISSION	CONCENTRATION APPARENTE DE SELENIUM DANS LE TOLUENE
5 μg	424	553	1,67 $\mu\text{g/ml}$
-	420-421	551	0,84 $\mu\text{g/ml}$
-	411	519	0,42 $\mu\text{g/ml}$
-	394	507	0,21 $\mu\text{g/ml}$
-	393	506-507	0,10 $\mu\text{g/ml}$

- TROISIEME OBSERVATION :

25 mg du dérivé synthétisé, diamino-2,3 phényl piazsélénol, ont été dissous dans 50 ml de toluène. A la solution obtenue, correspondaient deux maximums d'excitation et d'émission, respectivement à 449 et 557 nm. 0,2 ml de cette solution ont été prélevés et dilués à 5 ml avec du toluène dans un ballon jaugé de 5 ml. De nouveau, 0,1 ml de cette solution ont été prélevés et dilués à 5 ml.

Les spectres d'excitation et d'émission de ces trois solutions ont été tracés, les longueurs d'onde maximales d'excitation et d'émission ont été mesurées.

	λ MAX. D'EXCITATION	λ MAX. D'EMISSION	CONCENTRATIONS REELLES
0,25 mg/5 ml	449	557	13,652 $\mu\text{g/ml}$
0,2 ml de la solution précédente dilués à 5 ml	422	546	0,4608 $\mu\text{g/ml}$
0,1 ml de la solution précédente dilués à 5 ml	414	520	0,0109 $\mu\text{g/ml}$



VARIATION des LONGUEURS D'ONDE MAX D'EXC. et D'EMI.
en fonction de la CONCENTRATION

Les concentrations en sélénium sont des concentrations réelles puisqu'il s'agit d'une quantité bien déterminée dissoute dans un volume connu de solvant. Cependant, dans les cas précédents, il ne s'agissait que de concentrations apparentes répondant aux conditions opératoires fixées.

3.2.3.2. Interprétation des résultats :

L'observation d'une variation de la longueur d'onde maximale d'excitation ou d'émission en fluorescence nous amène à envisager les possibilités suivantes :

- effet de solvant ;
- effet de pH ;
- liaisons hydrogènes ;
- effet de concentration.

Les deux premières possibilités sont à rejeter : la première puisqu'on travaille toujours avec le même solvant, et la deuxième puisque l'extraction est réalisée toujours au même pH.

3.2.3.2.1. - LIAISONS HYDROGENES AVEC LE SOLVANT ET LES SOLUTES :

Les interactions par liaisons hydrogènes entre une molécule aromatique substituée (OH, NH₂, COOH) et les molécules du solvant et d'autres solutés affectent considérablement les spectres d'excitation et d'émission de la molécule en question en spectrofluorimétrie.

Ainsi, lorsqu'une molécule A peut former une liaison hydrogène avec une molécule B du solvant ou d'un autre soluté pour donner le dérivé A-B, il y a possibilité du passage de ce dernier de l'état fondamental A-B à l'état singulet excité (A-B)* lors de l'activation :



La molécule A passant à l'état excité A* sous l'action de l'irradiation hν peut, elle aussi, former dans certains cas une liaison hydrogène avec B. On aura :



Dans le premier cas, aussi bien le spectre d'excitation que le spectre d'émission de A seront affectés par la liaison hydrogène avec B.

Dans le deuxième cas, la liaison hydrogène se forme uniquement après excitation, seul le spectre de fluorescence est affecté.

Or, les longueurs d'onde maximales d'excitation et d'émission sont affectées, mais :

- le toluène n'est porteur d'aucun groupement susceptible de donner une liaison hydrogène tel que NH_2 , OH , COOH ou SH ; par suite, il ne peut pas s'agir d'interaction molécule - solvant ;
- la diamino-3,3' benzidine peut être extraite à partir du pH 7, et la possibilité de formation de liaison hydrogène avec la diamino-2,3 phényl piazsélénol existe. Cette hypothèse est à rejeter puisque la diamino-2,3 phényl piazsélénol pure, obtenue par synthèse, montre le même phénomène en solution.

3.2.3.2.2. - EFFET DE CONCENTRATION :

Une molécule aromatique A porteuse de groupements amines NH_2 libres peut former des dimères par liaisons hydrogènes avec d'autres molécules A. Ceci a lieu particulièrement dans les solvants apolaires ou aprotiques avec lesquels il n'y a pas de liaisons hydrogènes :



Une deuxième possibilité existe là aussi. La molécule A, passant à l'état de singulet excité, donne une liaison hydrogène avec une deuxième molécule :



Dans le premier cas, les deux maximums d'excitation et d'émission sont affectés, alors que dans le deuxième, seul le maximum d'émission est touché.

Le diamino-2,3 phényl piazsélénol porteur de groupements NH_2 libres forme des dimères en solution (à l'état fondamental), entraînant la déviation des longueurs d'onde maximales d'absorption et d'émission vers les grandes valeurs. A ce phénomène, on donne le nom de "dimers quenching".

3.2.3.3. Recommandations :

Lors d'un dosage spectrofluorimétrique, nous avons l'habitude de partir de la longueur d'onde maximale d'excitation et de tracer le spectre de fluorescence du dérivé pour s'assurer de la spécificité de la méthode. Dans ces conditions et dans le cas du sélénium, des valeurs fausses seront mesurées. Il en est de même si on se met aux deux longueurs d'onde maximales d'activation et d'émission comme le montre le tableau suivant :

UF

00

80

60

40

20

00

λ MAX D'EX et D'EM correspondant
à chaque concentration.

λ D'EX 423 nm
 λ D'EM 549 nm

1

2

3

4 mcg de Se



BLANC	λ D'EXCITATION 423 λ D'EMISSION 549	λ MAX. D'EXCITATION & λ MAX. D'EMISSION correspondant à chaque concentration
Blanc	9,3	-
1	35	47,5
2	58	51,5
3	80,5	81,0
4	100	100

- N.B. : Les résultats sont exprimés en unités fluorimétriques.

Par contre, en se fixant à deux longueurs d'onde 423 et 549 maximales correspondant à la prise d'essai de 4 μg , une droite parfaitement linéaire est observée. Ceci explique, encore une fois, la multitude de longueurs d'onde d'excitation et d'émission proposée par différents auteurs et trouvée dans la littérature.

3.2.4. - Domaine d'application :

Plusieurs séries de mesures ont été faites en partant d'une prise d'essai contenant une quantité variable de sélénium variant de 0,1 à 18 μg . Tous les réactifs sont introduits, y compris l'acide chlorhydrique, seul l'acide nitrique n'a pas été ajouté. Le volume final a été de 30 ml et extrait avec 3 ml de toluène.

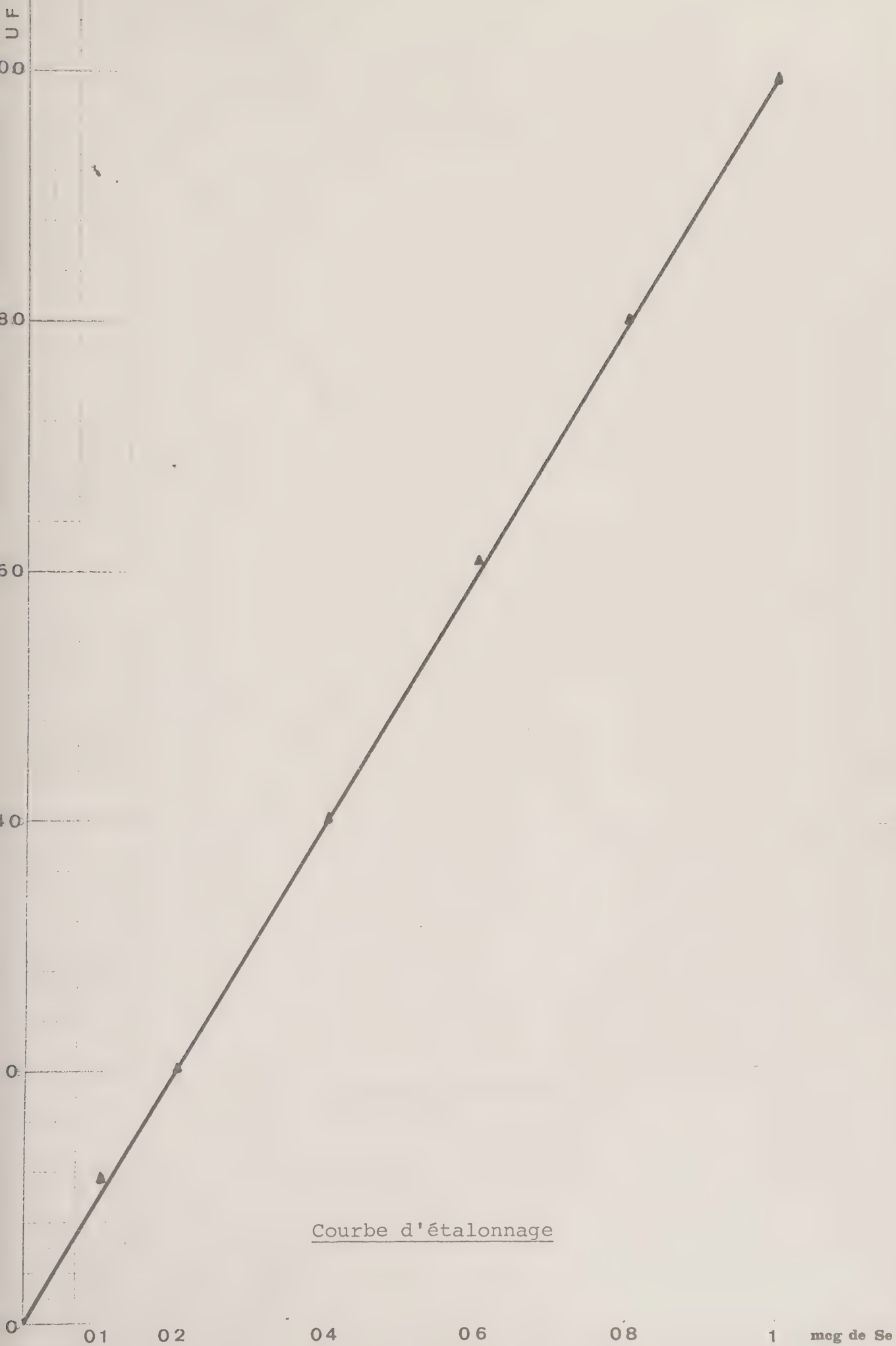
- PREMIERE SERIE : 0,1 à 1 μg de sélénium.

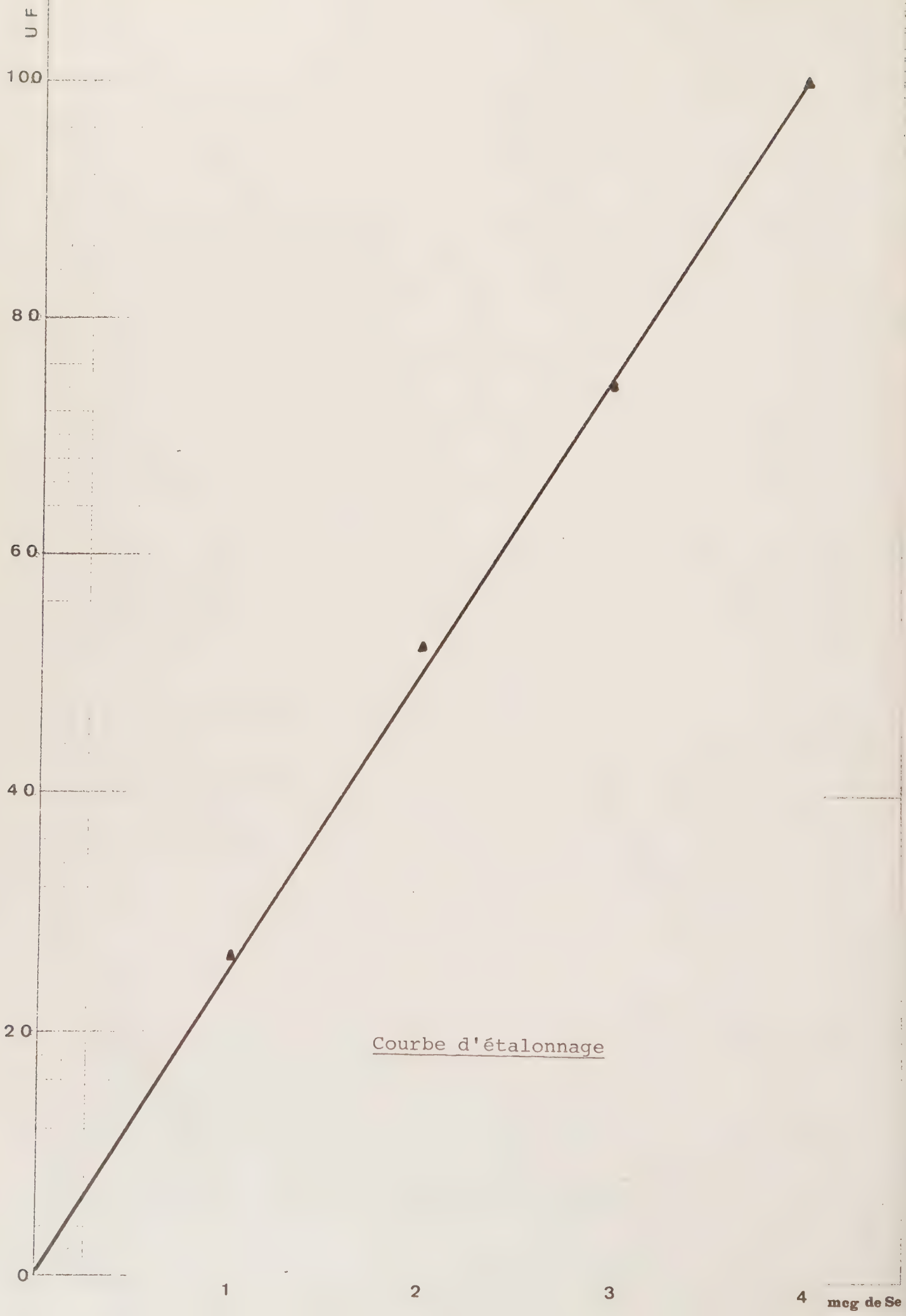
Bouton de sensibilité : 0,1 μA .

Le 100 % du galvanomètre est fait sur 1 μg et le zéro sur le blanc.

BLANC	0,1 μg	0,2 μg	0,4 μg	0,6 μg	0,8 μg	1,0 μg
0	0,12	0,20	0,41	0,62	0,80	100
0	0,11	0,20	0,39	0,605	0,81	100

- N.B. : Les résultats sont exprimés en unités fluorimétriques.





UF

0.0

80

60

40

20

0

1

2

4

6

8

10

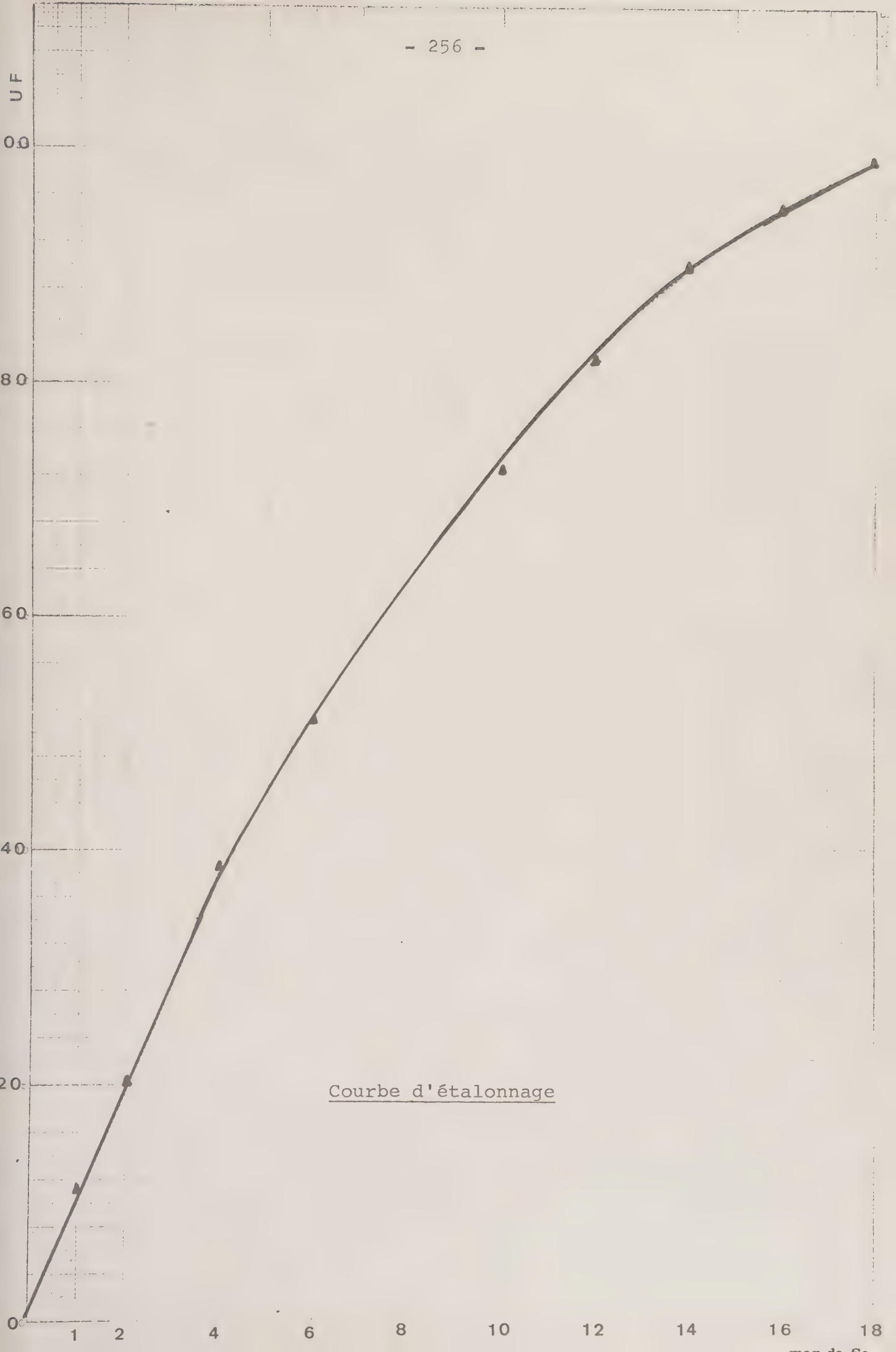
12

14

16

18

Courbe d'étalonnage



La sensibilité est définie par la pente de la droite, elle est de 0,01 μg par prise d'essai d'urine (2 ml).

- DEUXIEME SERIE : 1 à 4 μg de sélénium.

Bouton de sensibilité : 0,3 μA .

Le 100 % du galvanomètre est fait sur 4 μg et le zéro sur le blanc.

BLANC	1 μg	2 μg	3 μg	4 μg
0	24	51,5	74	100
0	26	51	72	100

- N.B. : Les résultats sont exprimés en unités fluorimétriques.

Sensibilité : 0,04 μg par prise d'essai.

On se limite à 4 μg puisque, au de-là de cette valeur, l'intensité de la fluorescence en fonction de la concentration ne suit plus une relation linéaire.

BLANC	1 μg	2 μg	4 μg	6 μg	10 μg	12 μg	14 μg	16 μg	18 μg
0	10,05	20	39	50	72	82	90	96	100
0	12	20	38	52	72,5	82,5	90	94	100

- N.B. : Les résultats sont exprimés en unités fluorimétriques.

Le 100 % est fait sur 18 μg et le zéro sur le blanc.

Bouton de sensibilité : 1 μA .

3.2.5. - Blanc réactif - Limite de détection :

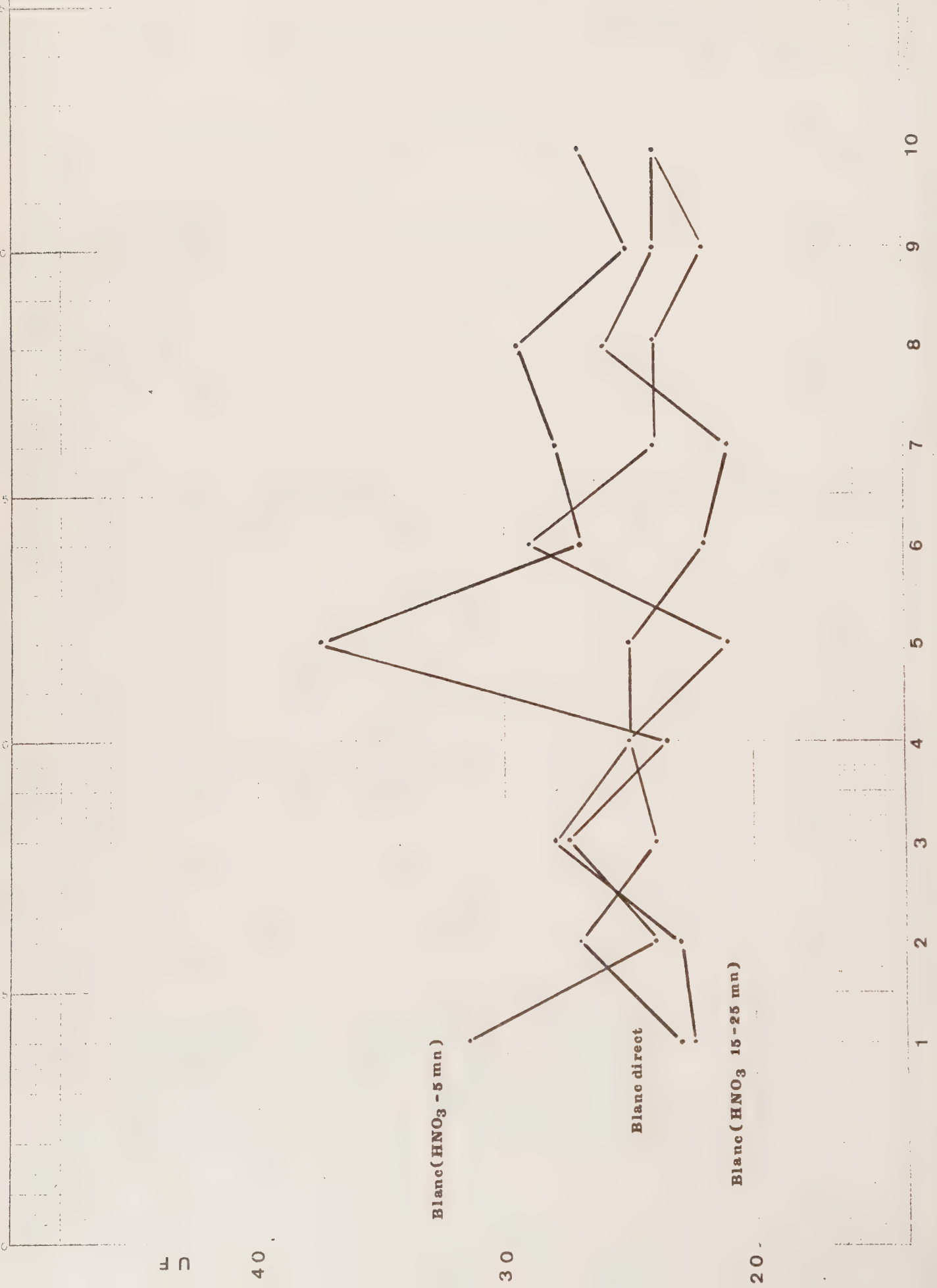
3.2.5.1. Blanc réactif :

Le blanc peut être réalisé de deux manières : soit, comme dans le cas d'un dosage de sélénium, dans un milieu biologique, soit en l'absence de minéralisation, ce qui implique que l'addition de l'acide nitrique et son élimination ne sont pas nécessaires. Nous avons aussi étudié l'influence de la minéralisation sur la reproductibilité des valeurs du blanc, dans le cas où cette étape semble être indispensable.

Pour cela, 10 blancs ont été préparés directement, 20 autres après élimination de l'acide nitrique. 10 échantillons parmi ces 20 ont subi un chauffage normal (15-20 mn) et 10 autres un chauffage rapide (5 mn).

Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant (le 100 % est fait sur une prise d'essai de 0,1 µg et le zéro sur le toluène) :

	BLANC DIRECT	BLANC addition et élimination de l'acide nitrique (15-20 mn)	BLANC addition et élimination de l'acide nitrique (5 mn)
	23	22,5	31,5
	27	23	24
	24	28	27,5
	25	25	23,5
	21	25	37,5
	29	22	27
	24	21	28
	24	26	29,5
	22	24	25
	24	24	27
Moyenne en unités fluo- rimétriques	24,3	24,05	28,09
Ecart-type absolu en unités fluo- rimétriques	2,193	1,955	3,902
Ecart-type relatif	9,025 %	8,129 %	13,91 %



Les résultats montrent :

- que la préparation du blanc peut être effectuée directement et que l'addition de l'acide nitrique et son élimination ne sont pas nécessaires puisque la différence observée entre les moyennes n'est pas significative, comme le montre le test de Student qui donne pour t la valeur de 0,26. La reproductibilité et, par suite, l'écart-type, ne sont pas affectés ;
- que dans le cas où l'élimination de l'acide nitrique est effectuée rapidement (en moins de 5 mn), aussi bien la moyenne ($t = 2,51$) que la reproductibilité sont atteintes. On observe une augmentation de la valeur du blanc et de l'écart-type, ce qui rend moins bonne la limite de détection.

3.2.5.2. Limite de détection :

Nous avons défini la limite de détection comme étant égale à deux fois l'écart-type correspondant à la moyenne des valeurs du blanc observées :

$LD = 0,044 \mu\text{g}$ par prise d'essai (2 ml d'urine)

ou $LD = 0,044 \times 500 = 22 \mu\text{g}$ de sélénium par litre d'urine.

Cette limite de détection est insuffisante puisque, comme nous allons le voir, la teneur moyenne en sélénium des urines analysées est largement inférieure à cette valeur.

3.3. DIAMINO-2,3 NAPHTALENE -

La limite de détection observée lorsque la diamino-3,3' benzidine est utilisée comme réactif de complexation du sélénium n'est pas suffisamment faible pour permettre le dosage de cet élément à l'état de traces. Ceci nous a amené à rechercher un autre réactif capable de donner avec le sélénium un complexe dont le rendement de fluorescence est nettement élevé, améliorant ainsi la limite de détection, la sensibilité, et permettant de rendre la détection de traces, chose facile et courante. Nous avons étudié le diamino-2,3 naphthalène proposé par LOTT en 1963.

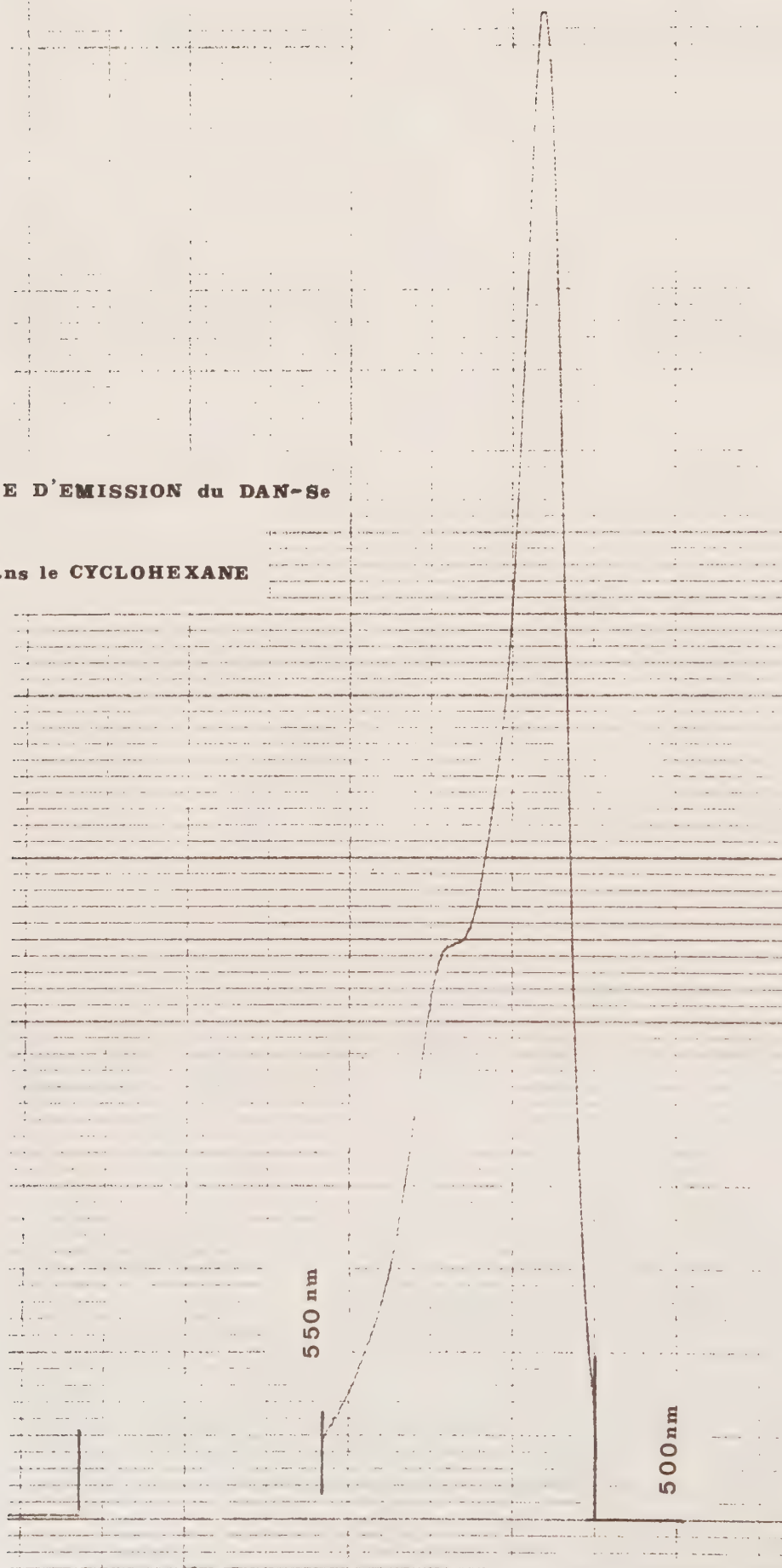
3.3.1. - Conditions opératoires :

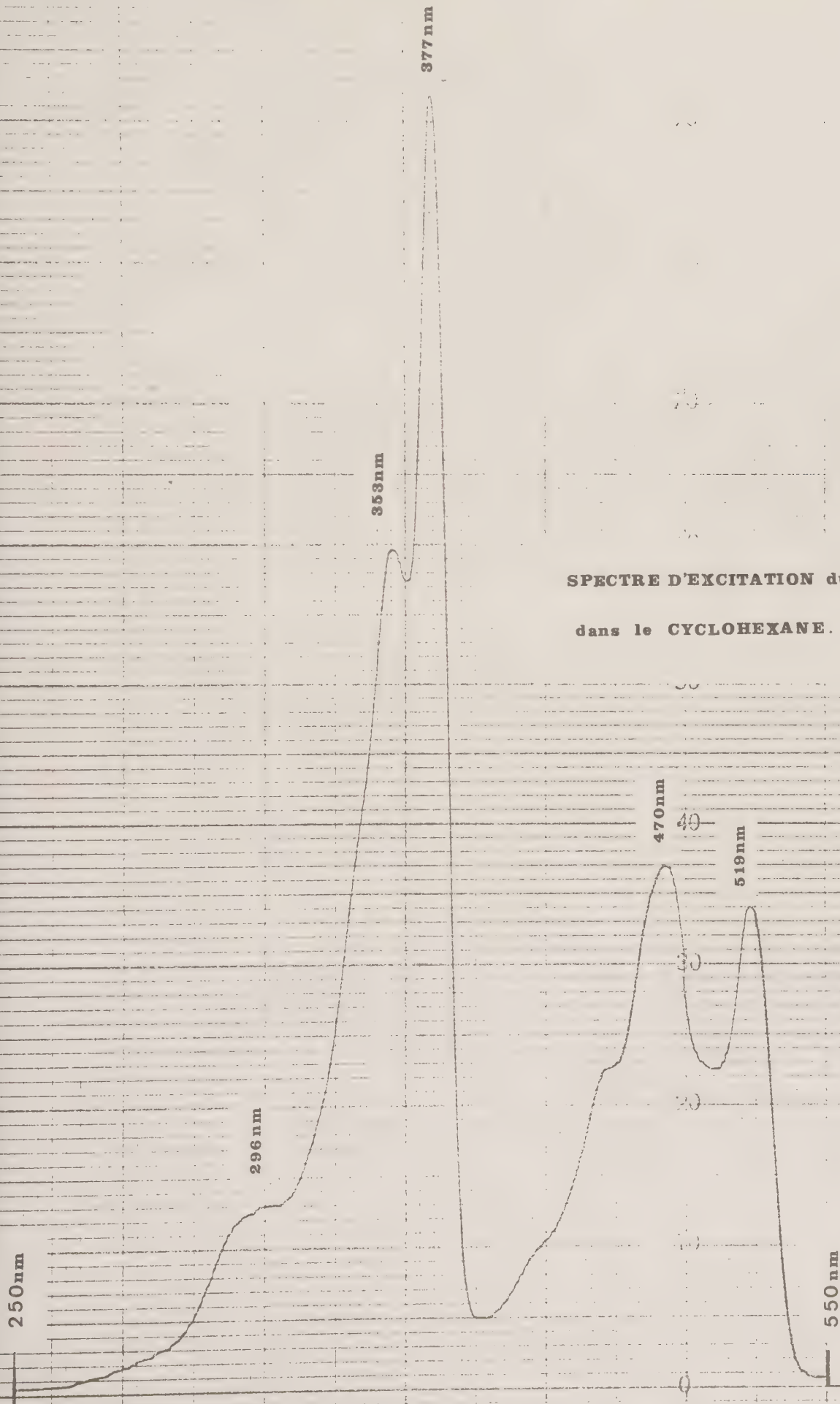
3.3.1.1. Spectres d'excitation et d'émission du complexe DAN-Se dans le cyclohexane :

Il s'agit de spectres d'excitation et d'émission d'une solution renfermant $1 \mu\text{g}$ de sélénium (sélénite de sodium), dont le volume final est de 20 ml. L'extraction est effectuée avec 3 ml de cyclohexane. Le tracé du spectre d'excitation s'effectue entre les longueurs d'onde 550 et 250 nm, et celui d'émission entre 500 et 550 nm.

SPECTRE D'EMISSION du DAN-Se

dans le CYCLOHEXANE





SPECTRE D'EXCITATION du DAN-Se
dans le CYCLOHEXANE.

Les paramètres fixés sont les suivants :

Sensibilité..... 3 μ A
Fente..... 10 nm
Longueur d'onde d'excitation à laquelle
le spectre de fluorescence est tracé.. 377 nm
Longueur d'onde d'émission à laquelle
le spectre d'excitation est tracé..... 519 nm

Le spectre d'excitation de la molécule renferme plusieurs bandes correspondant aux longueurs d'onde maximales suivantes : 519, 470, 377, 353 et 296 nm, le spectre d'émission présente une seule bande à 519 nm.

Les quatre longueurs d'onde maximales visibles : 470, 377, 353 et 296 nm, correspondent au passage de la molécule de l'état fondamental S_1 aux différents états vibrationnels de l'état singulet S_1^* excité. Comme l'émission ne peut provenir que de l'état vibrationnel le plus bas de l'état excité S_1^* , une seule bande de fluorescence est rencontrée.

La bande à 377 nm présente sur les autres l'avantage d'une intensité de fluorescence nettement supérieure à celle des autres.

3.3.1.2. Influence du pH sur la réaction de complexation :

L'étude a été réalisée sur une prise d'essai de 0,1 μ g de sélénium sous forme de sélénite de sodium. Tous les réactifs ont été additionnés comme lors de la préparation d'un témoin de dosage. Le pH a été amené à la valeur désirée avec de l'ammoniaque diluée au demi.

Le développement de la coloration s'effectue au bain-marie à 50°C pendant 40 minutes. Le pH est amené à 2. Le volume final est de 20 ml et l'extraction est faite avec 5 ml de cyclohexane.

pH	< 0 sans NH ₄ OH	0	1,0	1,50	2,0	2,50	3,0	3,50
1	29	68,5	74	83,5	86	74	73	56
2	31	69	74	85	85	76	73	60
Moyenne...	30	68,75	74	84,25	85,5	75	73	58

- N.B. : Les résultats sont exprimés en unités fluorimétriques.

Le pH optimal pour la formation du complexe est situé entre les deux valeurs : 1,5 et 2,0.

3.3.1.3. Choix d'un indicateur de pH :

Le rouge de crésol en solution vire du rose au jaune à un pH voisin de 2.

3.3.1.3.1. - PREPARATION :

Dissoudre 0,1 g de rouge de crésol dans 2,65 ml d'hydroxyde de sodium 0,1 N additionnés de 20 ml d'alcool éthylique et compléter à 100 ml avec de l'eau.

3.3.1.3.2. - PRECISION :

A 5 témoins renfermant chacun tous les réactifs, une goutte de solution de rouge de crésol a été ajoutée à la micropipette. De l'ammoniaque diluée au demi est versée jusqu'à décoloration de la solution. La décoloration est observée uniquement en présence d'une microgoutte de solution de rouge de crésol. En présence d'une plus forte quantité, il y a virage du rouge au jaune. La décoloration n'est pas observée et, à ce moment, le pH aurait dépassé la valeur 2.

Les pH des 5 solutions ont été ensuite mesurés au pH-mètre :

Solution	1	2	3	4	5
pH.....	1,82	1,83	1,83	1,78	1,77

3.3.1.3.3. - INCIDENCE SUR LA FLUORESCENCE :

L'indicateur présent dans la solution (partiellement sous forme non dissociée) peut être extrait par le solvant organique en milieu acide et présenter, de ce fait, des interactions avec la fluorescence.

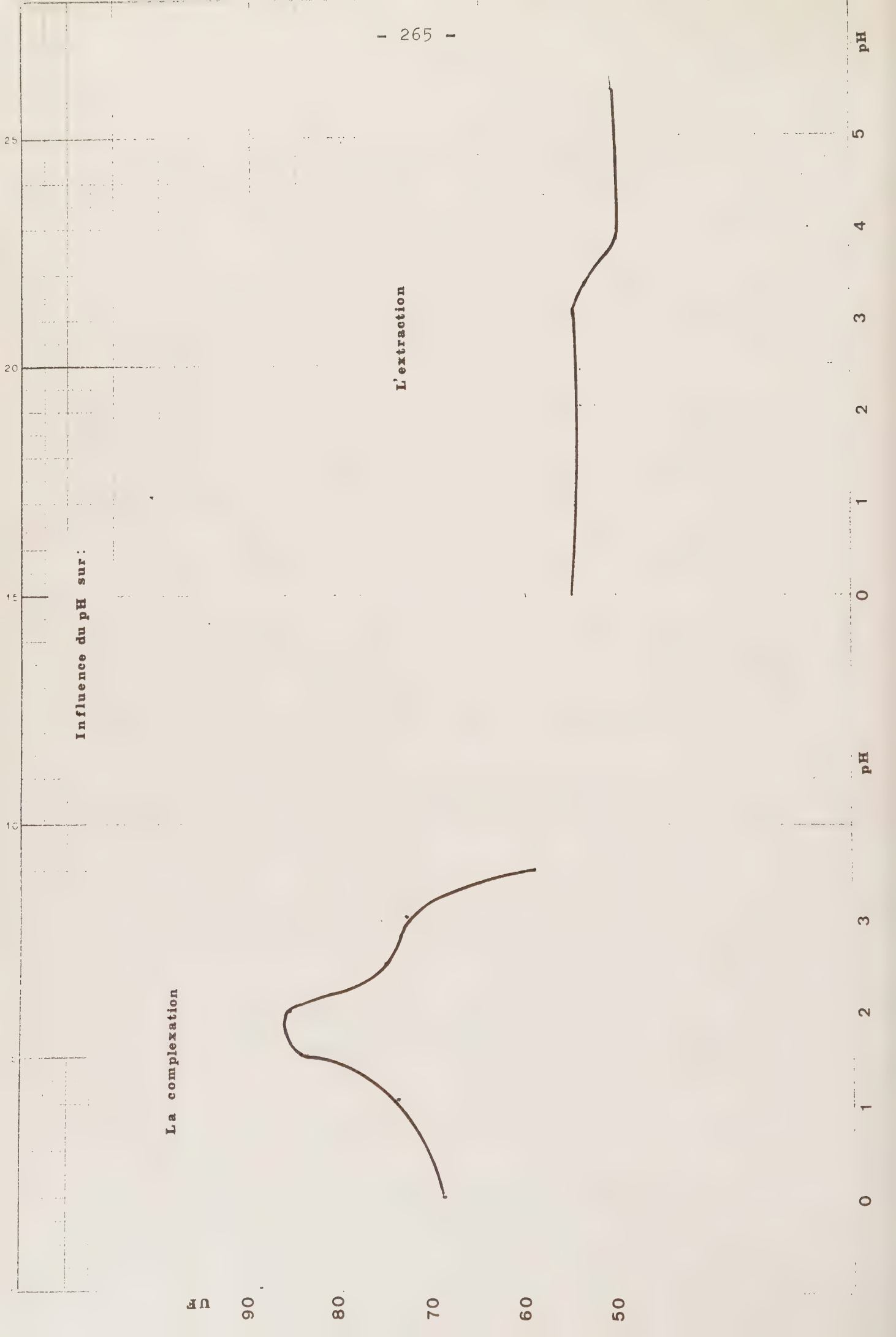
L'indicateur, s'il passe dans le cyclohexane, peut être soit fluorescent, soit, s'il ne l'est pas, absorber à la longueur d'onde d'émission du complexe DAN-Se, entraînant un phénomène de quenching et, par suite, une baisse de l'intensité de la fluorescence.

Deux séries de blanc ont été réalisées, l'une en l'absence, l'autre en présence de rouge de crésol. La fluorescence et l'absorbance relatives à chaque essai ont été mesurées à 519 nm.

Influence du pH sur :

La complexation

L'extraction



	FLUORESCENCE		ABSORBANCE	
	en l'absence de rouge de crésol	en présence de rouge de crésol	en l'absence de rouge de crésol	en présence de rouge de crésol
1	5,5	4,0	0,00	0,00
2	5,5	3,0	0,00	0,00
3	4,5	7,0	0,01	0,00
4	4,0	4,5	0,00	0,00
5	4,5	5,0	0,00	0,00
Moyenne	4,8	4,7	0,002	0,00

Le zéro de fluorescence est fait sur le cyclohexane et le 100 % sur le 0,1 µg.

D'après ces résultats observés, le rouge de crésol peut être utilisé comme indicateur de pH sans aucun inconvénient.

3.3.1.4. Influence du pH sur le rendement de l'extraction :

L'extraction a été réalisée à différents pH. Les valeurs observées sont les suivantes (prise d'essai de 0,1 µg de sélénium) :

pH.....	0	1	1,5	2	2,5	3	4	5,5
1	55	54,5	55	54	55	56	50	51,5
2	54,5	54	54	56	55	54	49	50

- N.B. : Les résultats sont exprimés en unités fluorimétriques.

Le pH a une très faible influence sur le rendement de l'extraction. Il est bien évident que le diamino-2,3 naphthalène donne avec le sélénium un complexe non chargé puisqu'il ne porte pas de groupements NH₂ libres se protonnant en milieu acide. L'extraction, comme il est prévu, est réalisable à ce pH.

3.3.1.5. Influence de la température sur la réaction de complexation :

Le développement de la fluorescence est activée par la chaleur. Au bain-marie bouillant, le développement est complet en moins de 10 minutes. Cependant, le diamino naphthalène est sensible à la chaleur, et il s'ensuit une décomposition.

La complexation peut être réalisée à température ambiante ou à 50°C sans observer une différence entre les valeurs des blancs observées dans les deux cas.

TEMPS TEMPERATURE	5'	10'	20'	30'	40'	60'	80'	100'	120'
ambiante...	22	37	56	67	70	69,5			
50°C.....	17	26	40,5	57,5	64,5	68	70,5	69	70

Cette étude a été réalisée sur une prise d'essai de 70 ng de sélénium.

Les valeurs des blancs en ng sont les suivantes :

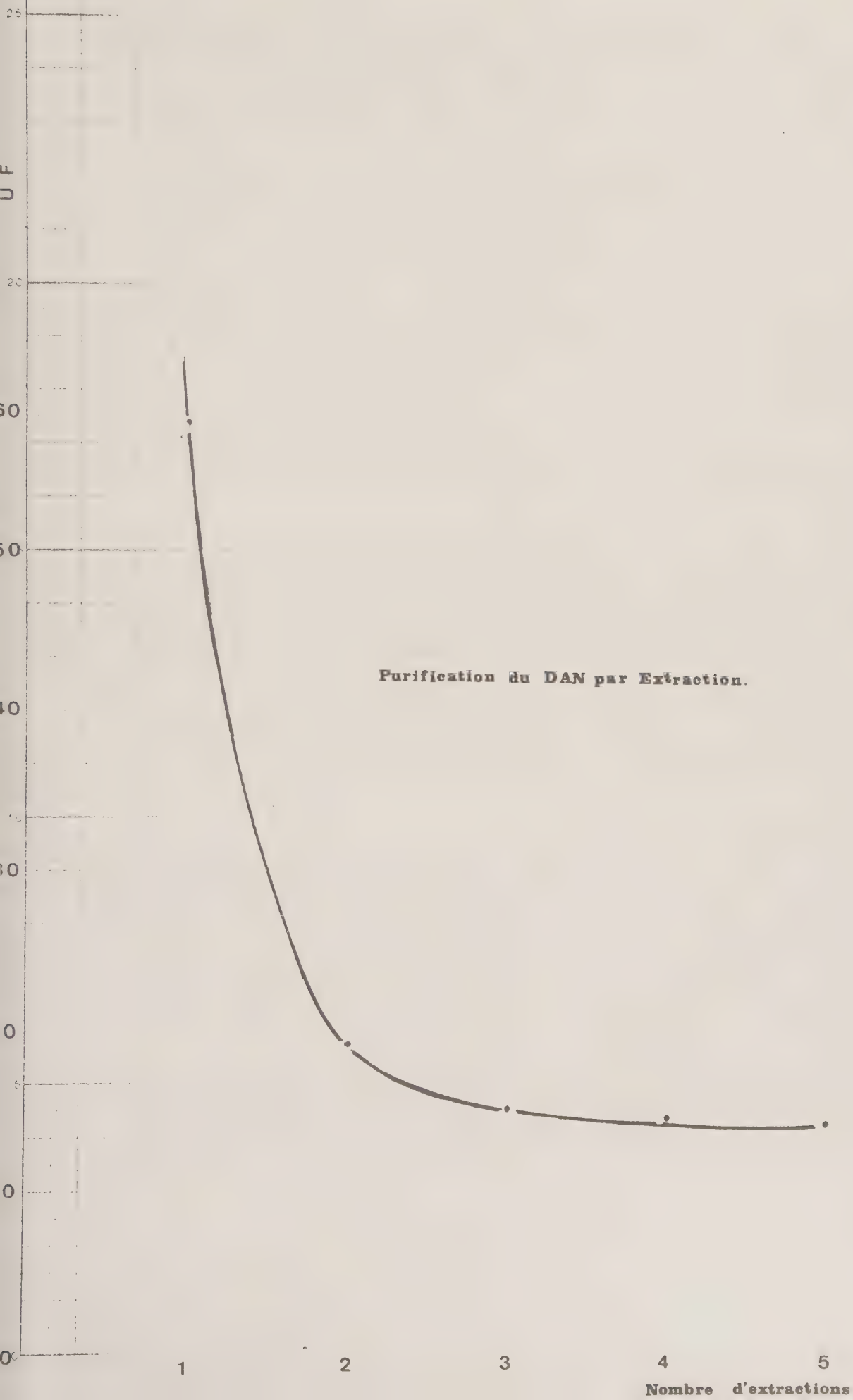
TEMPERATURE AMBIANTE	t = 50°C	t = 100°C
6,8	6,3	9,6
5,5	6,1	11,2

3.3.1.6. Purification du diamino-2,3 naphthalène :

3.3.1.6.1. - EXTRACTION :

Le diamino-2,3 naphthalène renferme un certain nombre d'impuretés et est instable en solution, pour s'oxyder rapidement en donnant une coloration jaunâtre extractible par le cyclohexane en milieu acide. Les impuretés présentes sont extractibles par le cyclohexane et émettent à la même longueur d'onde que le complexe DAN-Se, limitant ainsi la détection de la méthode et diminuant la sensibilité à la suite de l'élévation de la valeur du blanc réactif.

La méthode de purification la plus courante est l'extraction à pH voisin de celui du complexe DAN-Se par le même solvant organique utilisé pour l'extraction du complexe. Ainsi, à 100 ml de solution de diamino-2,3 naphthalène à 1 %



dans l'acide chlorhydrique au 1/100 (0,1 N) maintenue à 50°C au bain-marie pendant 40 minutes, 10 ml de cyclohexane sont ajoutés. On agite vigoureusement, on laisse décantier dans une ampoule à décantation et on sépare les deux phases. On recommence 4 fois l'extraction par un même volume de cyclohexane.

La fluorescence émise à 519 nm par excitation à 377 nm est mesurée : échelle de sensibilité = 0,1 μ A.

Les résultats sont les suivants :

Extraction...	1	2	3	4	5
Fluorescence.	58	19	15	14,5	14,0

Trois extractions successives sont considérées suffisantes pour éliminer les impuretés accompagnant le diamino-2,3 naphthalène.

3.3.1.6.2. - RECRISTALLISATION :

0,5 g de diamino-2,3 naphthalène ont été dissous dans 20 ml d'éthanol portés à ébullition, puis filtrés rapidement sur un papier Whatman N° 1. Le filtrat est placé dans un congélateur à -20°C. On voit l'apparition de cristaux de diamino-2,3 naphthalène qui seront séparés sur un buchner à travers un filtre en verre fritté, maintenu lui aussi à -20°C au congélateur. Le précipité est lavé avec de l'éthanol à 0°C. Le précipité est ensuite desséché à l'étuve à 40°C pendant 24 heures, puis conservé dans un flacon à l'abri de la lumière à -20°C.

- AVANTAGES :

La solution à 1 % de diamino-2,3 naphthalène purifié par recristallisation se conserve plusieurs jours au réfrigérateur sans observer de brunissement par oxydation du réactif (comme dans le cas du DAN purifié par extraction).

La valeur du blanc réactif est plus faible, elle est de 5,34 ng en moyenne, alors que celle du blanc réactif préparé avec le DAN non recristallisé est de 6,23 ng.

La différence est hautement significative pour un seuil de sécurité de 0,01 (le test de Student donne pour t la valeur de 3,93). Mais cette différence n'est pas suffisante pour que l'amélioration de la sensibilité soit nettement observée :

	1	2	3	4	5	6	7	8	MOYENNE
Blanc DAN (purifié par extraction)	6,58	5,78	5,69	5,91	6,18	6,71	6,31	6,71	6,23
Blanc DAN (purifié par recristal- lisation)	5,78	4,84	5,10	5,10	4,84	5,64	6,18	5,14	5,34

,- N.B. : Les résultats sont exprimés en ng de sélénium.

- INCONVENIENT :

Le rendement de la purification est faible : 40 %.

3.3.1.6.3. - PREPARATION DE LA SOLUTION
DE DIAMINO-2,3 NAPHTALENE :

La solution de diamino-2,3 naphthalène à 1 % a été réalisée par dissolution de ce dernier dans l'acide chlorhydrique dilué au 1/10 ($\approx$ 1 N). En effet, en milieu chlorhydrique $\approx$ 1 N, on observe moins d'émulsion lors de l'extraction avec le cyclohexane, et la séparation des deux phases est beaucoup plus rapide. Aucune différence n'est observée entre les blancs réactifs.

3.3.1.7. Photodécomposition et stabilité de la fluorescence
du complexe DAN-Se dans le cyclohexane :

3.3.1.7.1. - PHOTODECOMPOSITION :

L'étude a été réalisée sur une prise d'essai contenant 50 ng. Le volume final était de 20 ml et extrait avec 5 ml de cyclohexane.

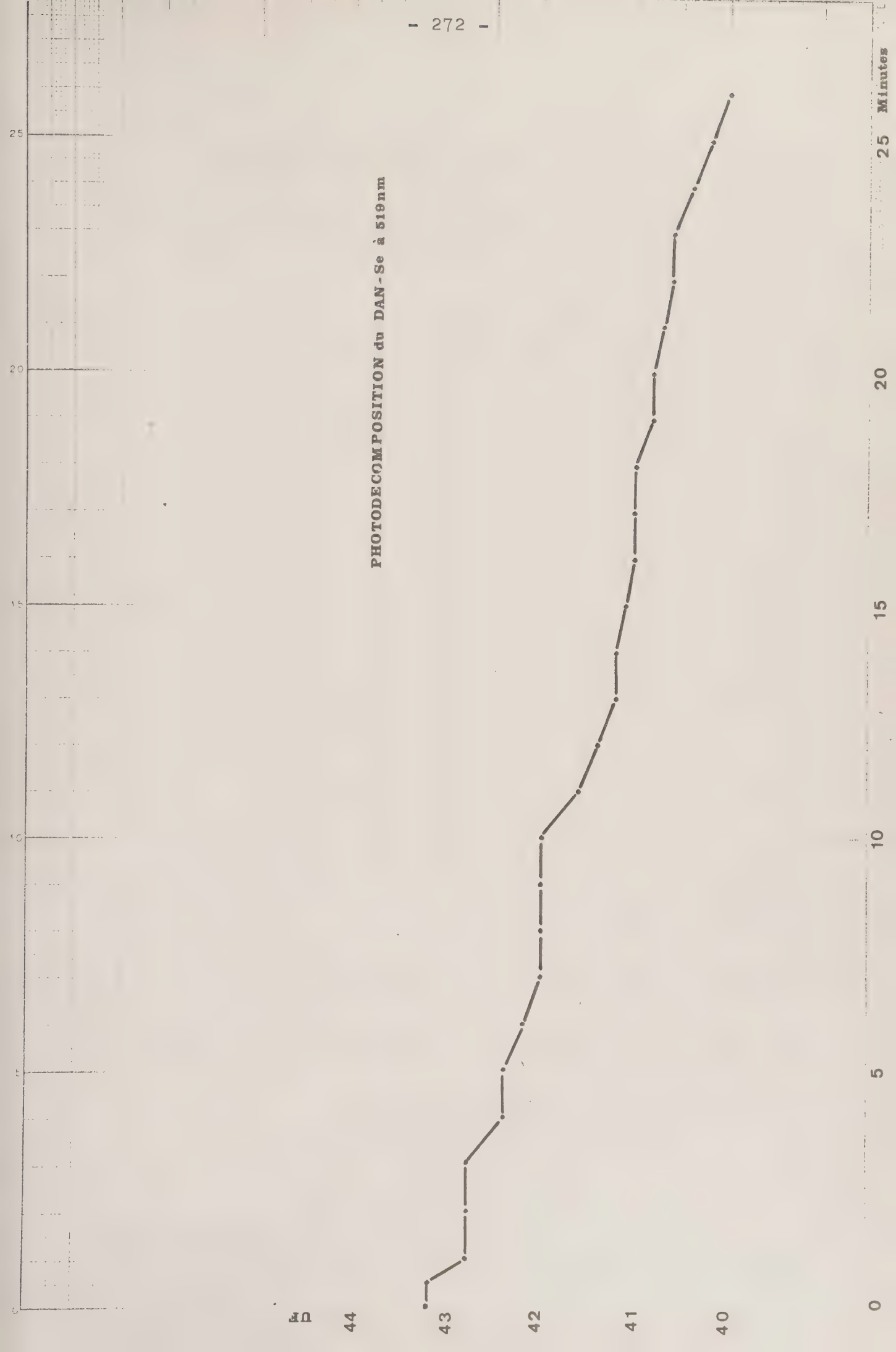
L'échantillon est irradié constamment à 377 nm et la fluorescence est mesurée à 519 nm. Un enregistreur couplé au fluorimètre donne en continu la variation de la fluorescence en fonction du temps (tableau p. 271).

La photodécomposition est moins importante que dans le cas de la diamino 2,3 phényl piazsélénol et va dans le sens contraire. Alors que pour la diamino-2,3 phényl piazsélénol la fluorescence, au bout de 20 minutes, a augmenté de 6,54 unités, elle a baissé de 2,4 unités en cas de phényl piazsélénol et pour la même durée d'irradiation.

Photodécomposition du phényl-piazsélénol dans le cyclohexane

TEMPS (minutes)	FLUORESCENCE
0	43,2
0,5	43,2
1	42,8
2	42,8
3	42,8
4	42,4
5	42,4
6	42,2
7	42,0
8	42,0
9	42,0
10	42,0
11	41,6
12	41,4
13	41,2
14	41,2
15	41,1
16	41,0
17	41,0
18	41,0
19	40,8
20	40,8
21	40,7
22	40,6
23	40,6
24	40,4
25	40,2
26	40,0

PHOTODECOMPOSITION du DAN-Se à 519nm



3.3.1.7.2. - STABILITE DE LA FLUORESCENCE
A L'OBSCURITE ET A LA LUMIERE :

L'étude a été effectuée sur deux prises d'essai de 100 ng de sélénium chacune. Le volume final et le volume de cyclohexane sont les mêmes que dans le cas précédent.

DUREE en minutes	OBSCURITE	LUMIERE
0	70	74
5	73	75
12	73	75,5
20	74	74,5
30	74	74
40	74	72,5
50	71	73
65	72,5	72
80	72,5	70,5
95	72,5	70,5
110	69,5	69,5
125	72,5	70,5

- N.B. : Les résultats sont exprimés en unités fluorimétriques.

La stabilité en fonction du temps est assez bonne bien qu'on puisse observer de légères variations.

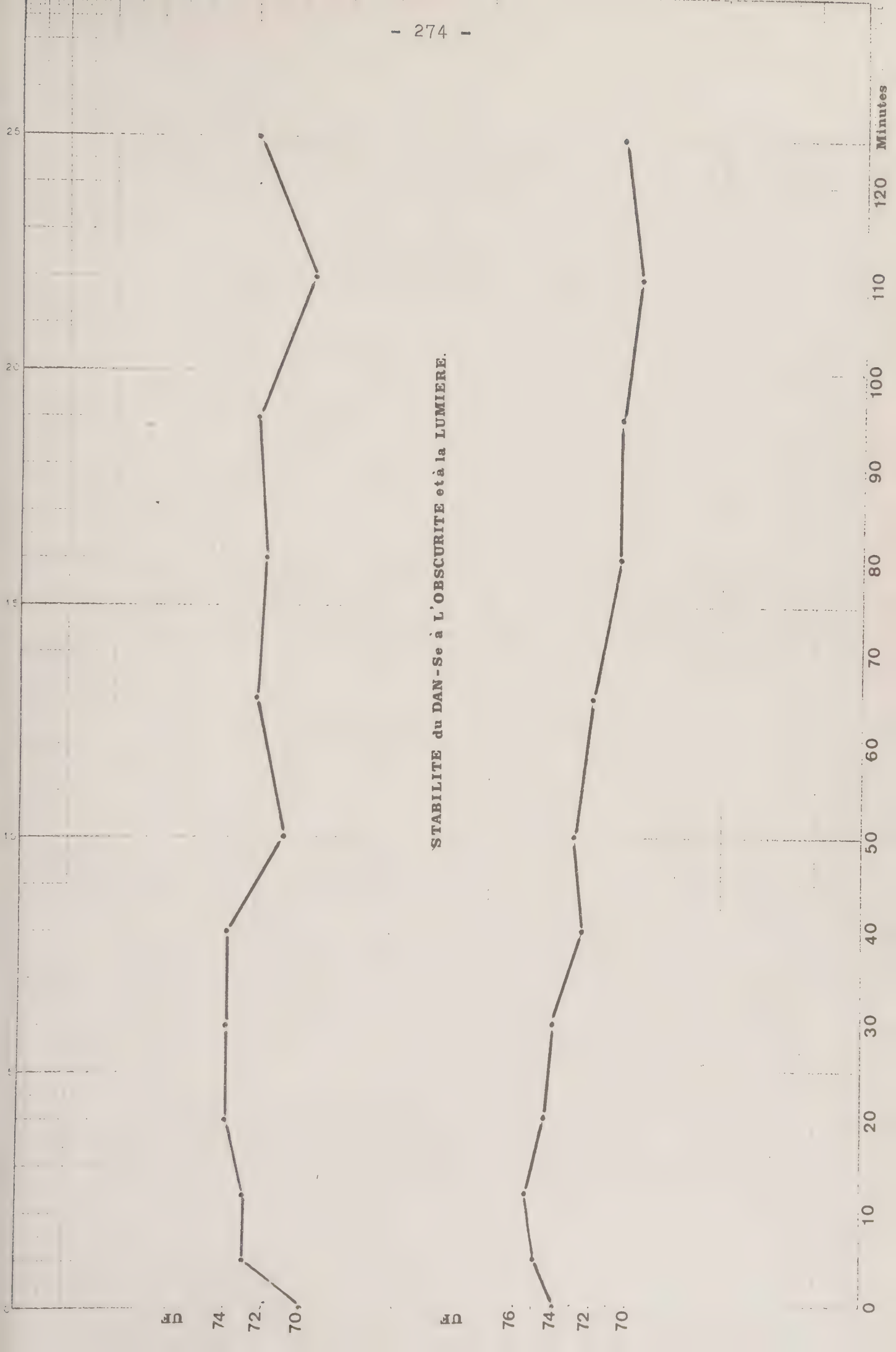
A la lumière, la stabilité du phényl piazsélénol est comparable à celle observée avec la diamino-2,3 phényl piazsélénol, tandis qu'à l'obscurité elle est meilleure.

3.3.1.8. Effets de la température et de l'oxygène dissous en solution :

3.3.1.8.1. - TEMPERATURE :

- DIAMINO-2,3 PHENYL MONOPIAZSELENOL :

40 ml de solution renfermant 2 µg de sélénium sont extraits avec 25 ml de toluène. 4 parties aliquotes de 5 ml chacune ont été mesurées dans des fioles jaugées de 5 ml,



puis portées à différentes températures pendant 20 minutes (les fioles sont bouchées pour éviter l'évaporation du solvant). La fluorescence est mesurée à 549 nm.

TEMPERATURE	FLUORESCENCE
0°C (glace fondante)	17,7
18°C	13
40°C	12,5
57°C	12,3

- PHENYL PIAZSELENOL :

50 ml de solution renfermant 1 µg de sélénium ont été extraits avec 25 ml de cyclohexane. Là aussi, 4 parties aliquotes de 5 ml chacune ont été prélevées et maintenues aux différentes températures. Le cyclohexane dans la fiole maintenue à 0°C se solidifie. La fluorescence est mesurée sur la partie en fusion (6,5°C - 7°C).

TEMPERATURE	FLUORESCENCE
6,5°C - 7°C	30
20°C	26
40°C	26,5
56°C	36

Une augmentation de la température entraîne une diminution de la viscosité du milieu et favorise, par la suite, la dissipation de l'énergie de l'état excité par relaxation non radiative par choc entre les molécules du soluté et les molécules du solvant. Ceci entraîne une chute de l'intensité de la fluorescence.

Dans le cas du phényl piazsélénol, l'augmentation de l'intensité de fluorescence observée à 56° est expliquée par le fait que la température est suffisamment élevée pour permettre le passage de l'état T_1^* à l'état S_1^* . Ce phénomène est aussi observé avec plusieurs dérivés, dont ceux de l'an-thraquinone.

INFLUENCE de la TEMPERATURE sur la FLUORESCENCE

FD

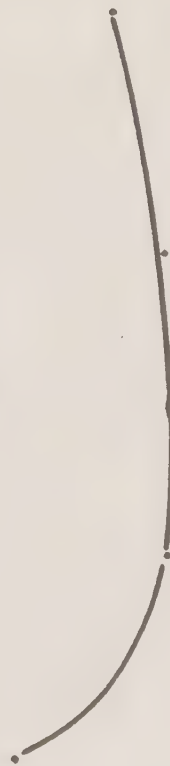
DAN - Se

DAB - Se

40
30
20
10
0

6,5 20 30 40 56 0 18 40 57

Temperature



3.3.1.8.2. - OXYGENE :

Pour chaque dérivé, l'étude a été réalisée sur deux prises d'essai identiques à celles utilisées dans l'étude précédente.

De chaque extrait final, 10 ml sont prélevés, mesurés dans une éprouvette graduée au dixième de millilitre ; on fait barboter ensuite l'azote pour une durée de 10 minutes. D'autres éprouvettes renfermant du solvant sont dégazées de la même façon.

Le volume des éprouvettes contenant l'extrait est réajusté à 10 ml avec le solvant dégazé

- DAN-Se -

- DAB-Se -

DOSAGE DIRECT	DOSAGE APRES ELIMINATION de l'O ₂	DOSAGE DIRECT	DOSAGE APRES ELIMINATION de l'O ₂
20	60	20	45
21	61	18	42

Le dégazage permet de multiplier la fluorescence par 3 lorsqu'il s'agit du complexe DAN-Se et par 1,5 dans le cas de DAB-Se.

L'oxygène agit en favorisant le phénomène de conversion interne.

3.3.2. - Domaine d'application :

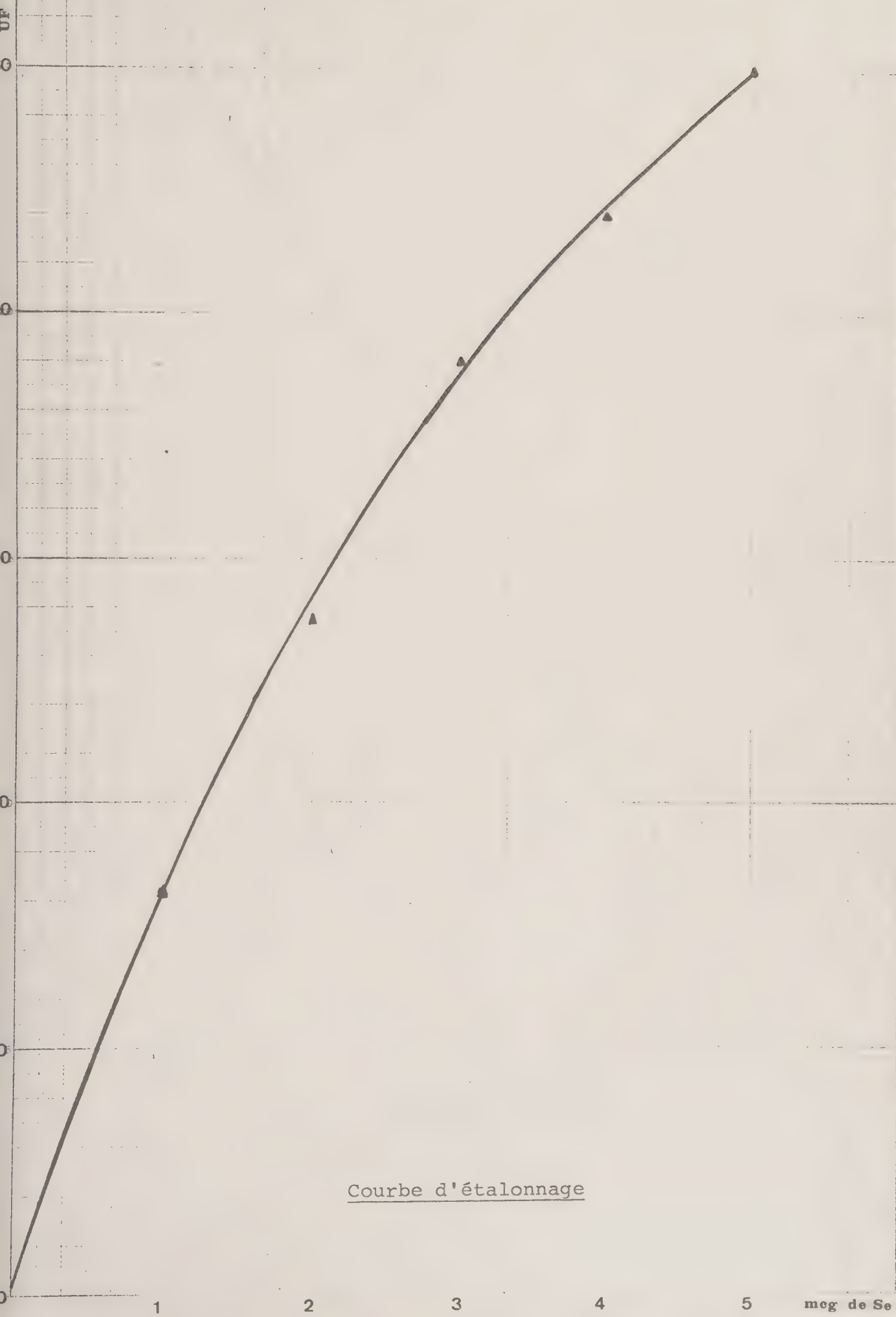
Plusieurs séries de mesures ont été faites en partant d'une prise d'essai contenant une quantité variable de sélénium allant de 0 à 5 µg. Le dosage est réalisé en présence de tous les réactifs (sauf l'acide nitrique). Le volume final est de 20 ml et est extrait avec 5 ml de cyclohexane.

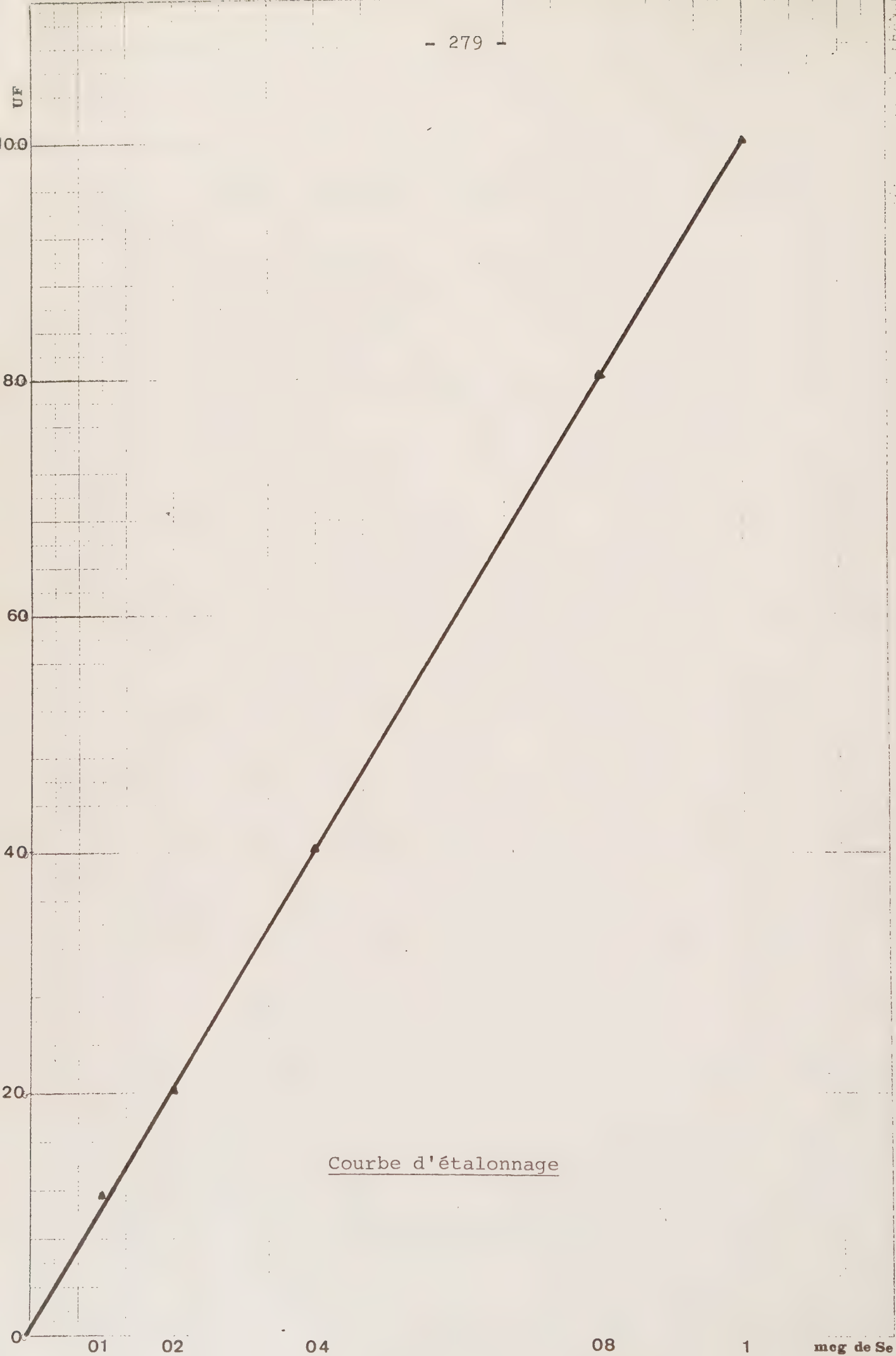
- PREMIERE SERIE : 1 à 5 µg de sélénium.

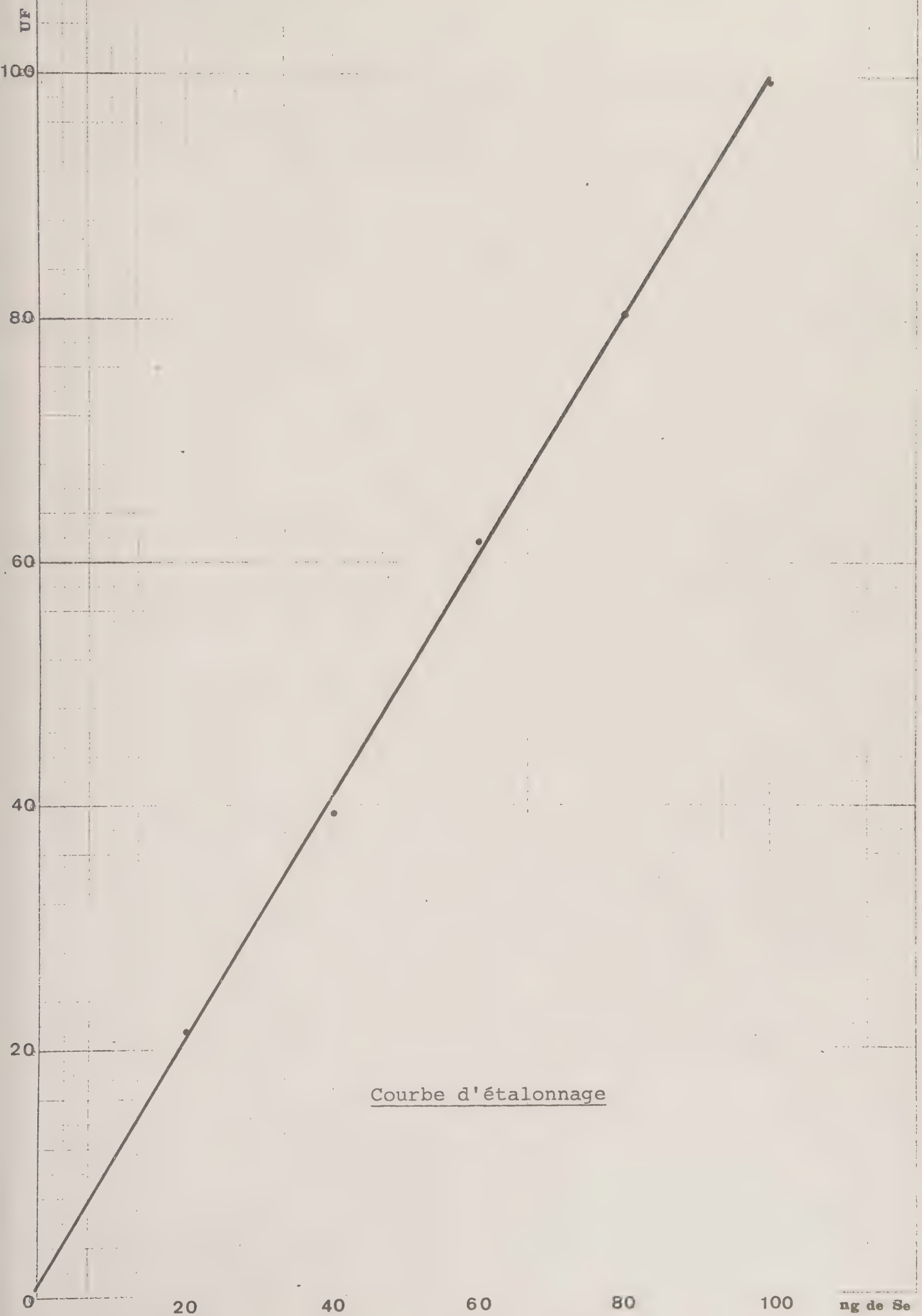
Bouton de sensibilité : 10 µA.

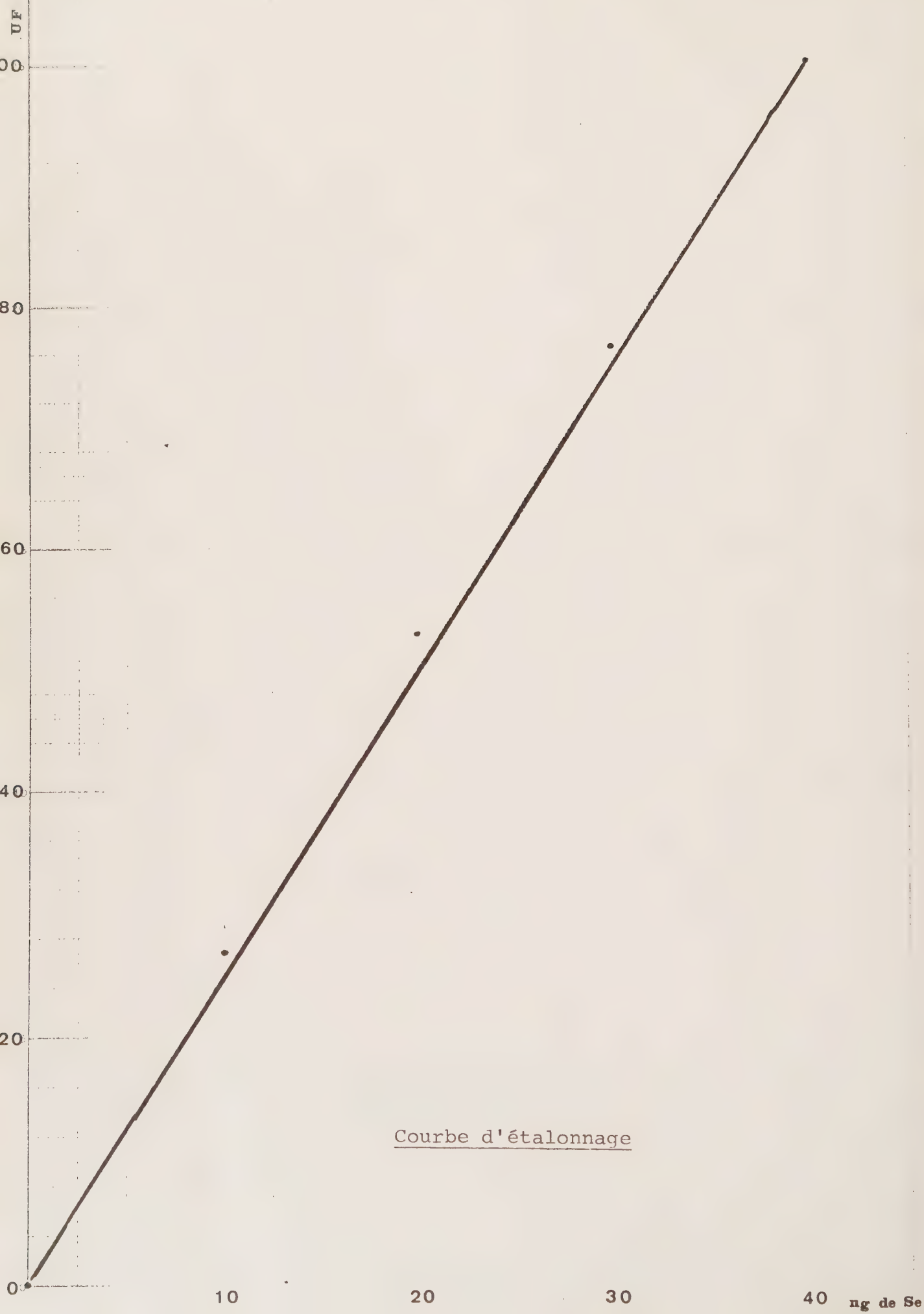
Le 100 % du galvanomètre est fait sur le 5 µg et le zéro sur le blanc.

BLANC	1 µg	2 µg	3 µg	4 µg	5 µg
0	32,5	55	76	88	100









- DEUXIEME SERIE : 0,1 à 1 µg.

Bouton de sensibilité : 3 µA.

Le 100 % du galvanomètre est fait sur le 1 µg et le zéro sur le blanc.

BLANC	0,1 µg	0,2 µg	0,4 µg	0,8 µg	1 µg
0	11,5	20	40,5	80	100

- TROISIEME SERIE : 0,02 à 0,1 µg.

Bouton de sensibilité : 0,3 µA.

Le 100 % du galvanomètre est fait sur le 0,1 µg et le zéro sur le blanc.

BLANC	100 ng	80 ng	60 ng	40 ng	20 ng
0	100	79,5	61	40,5	24
0	99,5	81	62,5	38	19

- QUATRIEME SERIE : 10-40 ng.

Bouton de sensibilité : 0,1 µA.

Le 100 % est fait sur le 40 ng et le zéro sur le blanc.

BLANC	10 ng	20 ng	30 ng	40 ng
0	26	54	76	100
0	28	52	77	100

- CONCLUSION :

Le domaine d'application s'étend de 0 à 1 µg par prise d'essai.

3.3.3. - Blanc réactif - Limite de détection :

3.3.3.1. Blanc réactif :

Là aussi, comme dans le cas de la diamino-3,3' benzidine, nous avons étudié la manière dont le blanc doit être réalisé : directement ou après addition d'acide nitrique et distillation. Les résultats ne montrent aucune différence significative (coefficient de Student $t = 0,18$).

	BLANC DIRECT	BLANC APRES MINERALISATION
	6,58 ng	6,18 ng
	5,78 ng	5,91 ng
	5,64 ng	5,24 ng
	5,91 ng	6,58 ng
	6,18 ng	6,18 ng
	6,71 ng	6,99 ng
	6,31 ng	6,85 ng
	6,71 ng	5,51 ng
Moyenne.....	6,23 ng	6,18 ng
s.....	0,39 ng	0,58 ng

3.3.3.2. Limite de détection :

La limite de détection est définie comme étant égale à 2 fois l'écart-type correspondant à la moyenne des valeurs du blanc observées (seuil de sécurité : 0,05) :

$$LD = 2 \times 0,394 = 0,788 \text{ ng/prise d'essai}$$

ou 0,39 µg/litre d'urine (prise d'essai = 2 ml)
ou 0,16 µg/litre d'eau (prise d'essai = 5 ml).

3.4. INTERFERENCES -

Les possibilités d'interférences avec les autres éléments présents ont été étudiées et revues en détail par TAUSSKY (413), LOTT (242) et SHAWKY (377). En cas de diamino-benzidine, les ions Cu^{++} , Cd^{++} , Co^{++} , Ni^{++} , Pb^{++} , W^{6+} , As^{3+} et Mg^{++} , peuvent interférer à une concentration 10 fois plus élevée que celle du sélénium. Par contre, le dosage en présence de diamino-naphtalène est hautement spécifique. Seuls le Cu^{++} et le Pb^{++} sont capables d'interférer lorsque leurs teneurs dépassent 3 mg et 10 mg par prise d'essai, respectivement.

4. PROTOCOLE UTILISE

Vu la bonne reproductibilité de la méthode utilisant comme réactif de "complexation" du sélénium le diamino-2,3 naphthalène, sa bonne sensibilité et sa limite de détection très faible, nous l'avons adopté pour le dosage du sélénium dans les milieux biologiques et dans les eaux.

4.1. DOSAGE DU SELENIUM DANS LES URINES -

Prélever 2 ml d'urine dans un micro-Kjeldahl ou un erlen de 50 ml muni d'un coude.

Ajouter 7,5 ml d'acide nitrique concentré et 2,5 ml d'acide perchlorique pur.

Minéraliser au bain de sable porté à 140-160°C. Eliminer l'acide nitrique (15-20 mn), puis chauffer le reste perchlorique pendant 30 minutes de façon que les vapeurs se condensent à l'intérieur.

Laisser refroidir. Ajouter 2 à 3 ml d'eau bidistillée et faire évaporer pendant 30 secondes à 1 minute.

Au volume final (4-5 ml) ajouter 2,5 ml d'acide chlorhydrique au 1/10. Porter au bain-marie bouillant pendant 30 minutes.

Laisser refroidir. Ajouter successivement :

- 5 ml de solution d'hydroxylamine, sel sodique de l'acide éthylène diamine tétracétique (2,5 g + 1 g par 100 ml, respectivement) ;
- 1 microgoutte de solution de rouge de crésol à 1 o/oo ;
- 5 ml de solution de diamino-2,3 naphthalène à 1 % dans l'acide chlorhydrique au 1/10 ;
- puis de l'ammoniaque au 1/2 jusqu'à décoloration de l'indicateur.

Laisser développer la réaction au bain-marie à 50°C pendant 40 minutes. Refroidir.

Extraire la solution aqueuse après avoir ajusté le volume à 20 ml avec 5 ml de cyclohexané.

Laisser refroidir dans de la glace fondante. Séparer les deux phases. Mesurer la fluorescence à 519 nm avec une longueur d'onde d'excitation de 377 nm (fluorimètre JOBIN-YVON).

Préparer en même temps une gamme étalon. La gamme sera choisie en fonction de la teneur en sélénium de l'échantillon.

Procéder de la même manière que pour le dosage. Ajouter 2,5 ml d'acide perchlorique et la quantité de sélénium, puis continuer le dosage comme précédemment à partir de : "au volume final, ajouter 2,5 ml d'acide chlorhydrique ...").

Faire le 100 % de l'appareil sur la valeur la plus élevée de l'étalon et le zéro sur le blanc réactif.

4.2. DOSAGE DU SELENIUM DANS LES EAUX -

Lorsqu'il s'agit de faire le dosage du sélénium dans les eaux, prélever 5 ml d'eau, ajouter 2,5 ml d'acide chlorhydrique au 1/10 et continuer comme précédemment.

5. APPLICATIONS

5.1. DETERMINATION DE LA TENEUR MOYENNE NORMALE DE SELENIUM DANS LES URINES -

Une enquête a été réalisée en vue de déterminer les teneurs moyennes en sélénium de la population dans la région lyonnaise. Les urines ont été prélevées à deux endroits différents :

- 1) à l'hôpital Edouard Herriot : urines provenant de sujets à la suite de leur admission à l'hôpital ;
- 2) à l'Institut Pasteur de Lyon.

Le nombre total des observations est de 93.

5.1.1. - Mise en place des observations :

Nous avons dressé le tableau de distribution des fréquences qui a 4 colonnes : une colonne pour les classes, la seconde pour les fréquences absolues, la troisième pour les fréquences relatives, et la quatrième pour les fréquences cumulées (voir p. 287).

5.1.2. - Représentation graphique :

Nous avons dressé l'histogramme de la distribution précédente : à chaque intervalle de classe, correspond un rectangle dont la hauteur est proportionnelle à la fréquence absolue de la classe. Nous parlons de hauteur et non de surface puisque les classes ont toutes le même intervalle.

CLASSE	FREQUENCE ABSOLUE	FREQUENCE RELATIVE	FREQUENCE CUMULEE
0 - 5 µg	8	0,086	0,086
5,1 - 10	40	0,430	0,516
10,1 - 15	20	0,215	0,731
15,1 - 20	12	0,129	0,860
20,1 - 25	6	0,064	0,924
25,1 - 30	3	0,032	0,956
30,1 - 35	1	0,011	0,967
35,1 - 40	1	0,011	0,978
40,1 - 45	1	0,011	0,989
45,1 - 50	1	0,011	1,000
50,1 - 55	0	0,000	1,000
55,1 - 60	0	0,000	1,000

T = 93

FREQUENCE ABSOLUE

40

30

20

0

0

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

**HISTOGRAMME de la distribution du
SELENIUM dans les URINES.**



TENEUR EN SELENIUM (mg/Litre d'urine)

ANALYSE Nº	AGE (ans)	SEXE	DIURESE (ml)	pH	TENEURS EN SELENIUM (µg/litre)
1	57	M	3.300	5,12	18,7
2	21	F	400	6,19	44,30
3	14	F	3.000	7,34	3,0
4	37	F	3.100	6,39	5,9
5	53	M	2.400	5,61	17,0
6	41	F	800	8,13	7,7
7	48	M	2.250	7,17	13,3
8	43	M	1.100	7,03	5,65
9	28	M	900	5,92	14,6
10	54	M	2.100	5,67	6,8
11	25	M	2.200	5,49	14,7
12	56	M	1.490	7,09	5,6
13	33	M	1.950	6,01	25,1
14	64	M	1.900	5,27	18,2
15	54	M	1.200	5,27	26,9
16	59	F	600	5,70	6,5
17	32	M	680	5,62	20,1
18	71	F	1.600	5,58	15,0
19	57	M	-	5,70	15,4
20	21	M	5.600	5,31	11,0
21	28	M	4.200	6,10	16,0
22	46	M	2.200	6,20	15,5
23	49	M	3.600	7,11	13,5
24	30	F	2.400	6,79	9,6
25	25	M	2.000	7,47	11,0
26	56	M	1.000	5,14	10,2
27	47	F	2.500	6,74	6,9
28	22	M	2.000	5,68	12,4
29	75	M	2.100	4,94	7,6
30	58	M	1.200	5,59	8,8
31	25	M	2.000	7,31	8,0
32	59	F	-	4,6	3,7
33	50	M	600	8,0	5,4
34	53	F	2.200	6,0	5,4

ANALYSE N°	AGE (ans)	SEXE	DIURESE (ml)	pH	TENEURS EN SELENIUM (µg/litre)
35	22	F	3.050	6,65	7,2
36	57	M	4.000	6,66	3,2
37	61	M	1.100	5,97	4,7
38	58	M	1.200	5,65	8,10
39	34	F	-	5,65	4,6
40	54	M	1.200	7,87	5,4
41	46	M	1.800	5,52	5,7
42	59	F	300	6,41	20,3
43	58	F	1.200	8,16	6,56
44	17	F	2.800	6,22	10,0
45	30	F	2.100	6,32	32,1
46	74	F	600	7,23	20,2
47	69	M	2.000	6,93	8,40
48	28	F	700	4,92	36,3
49	51	M	2.300	6,58	8,70
50	49	F	900	8,51	12,2
51	58	M	2.300	5,64	16,6
52	60	M	-	4,59	9,2
53	57	F	1.500	5,99	9,6
54	27	F	1.200	5,28	2,6
55	39	F	-	6,14	6,2
56	21	M	4.500	6,13	7,6
57	47	F	3.000	6,49	6,4
58	57	F	1.250	5,51	5,8
59	37	F	4.500	5,90	6,6
60	38	M	1.000	6,08	8,2
61	47	M	-	6,74	8,2
62	27	M	2.100	5,94	13,6
63	75	F	-	5,04	7,0
64	73	M	600	5,64	12,0
65	41	M	5.100	5,74	9,0
66	58	F	1.500	8,53	5,2
67	51	F	2.000	6,21	9,5

ANALYSE Nº	AGE (ans)	SEXE	DIURESE (ml)	pH	TENEURS EN SELENIUM (µg/litre)
68	37	F	2.000	6,97	12,8
69	77	F	300	8,93	4,2
70	27	M	3.000	6,44	3,1
71	46	F	2.500	6,60	8,5
72	55	F	800	6,35	16,75
73	60	M	2.000	8,33	14,5
74	22	M	2.000	5,73	15,5
75	67	M	-	5,29	11,75
76	27	F	-	5,18	10,25
77			1.600	6,85	17,25
78			-	7,31	16,75
79			-	8,99	22,50
80			1.400	-	5,41
81			1.500	-	6,66
82			1.860	-	8,33
83			950	-	20,5
84			3.500	5,02	9,25
85			1.100	-	11,50
86			3.600	7,93	8,0
87			1.100	4,28	25,5
88			1.200	8,93	24,5
89			1.250	6,37	13,5
90			1.900	7,82	14,75
91			1.000	6,15	13,0
92			1.000	5,86	15,5
93			950	9,09	47,0

5.1.3. - Caractéristiques :

- MOYENNE :

Teneur normale moyenne en sélénium = 12,30 µg/litre.

Ecart-type = 8,21 µg.

86 % des teneurs observées sont inférieures à 20 µg/litre.

La teneur moyenne normale est beaucoup plus faible que celle observée aux Etats-Unis il y a une vingtaine d'années et qui était de 48 µg/litre. Ceci est dû, évidemment, à l'absence de régions sélénifères en France et aux faibles teneurs du sol, que viennent confirmer les résultats obtenus au cours du dosage du sélénium dans différentes eaux. Une autre observation qui permet de justifier nos résultats est l'apparition fréquente du syndrome de carence d'origine nutritionnelle (DMN) frappant les veaux en France.

5.1.4. - Etude de la distribution

en fonction de différents paramètres :

5.1.4.1. Sexe :

SEXE EFFECTIF	MALE	FEMELLE
34	M = 11,74 s = 5,84	
33		M = 11,18 s = 9,66

- N.B. : Le sexe n'a pas été toujours précisé.

Les teneurs moyennes observées chez les mâles et les femelles et qui sont 11,74 et 11,18, respectivement, sont très voisines. Aucune variation des teneurs en fonction du sexe n'est observée (coefficient de Student t = 0,29).

5.1.4.2. pH des urines :

pH	EFFECTIF	MOYENNE ($\mu\text{g/l}$)	ECART-TYPE
< 5	5	16,46	13,87
5,1 - 6,0	33	11,24	5,20
6,1 - 7,0	28	13,01	9,06
7,1 - 8,0	13	10,04	5,27
8,1 - 9,0	8	12,17	7,82
> 9,0	1	47,0	-

Le pH ne semble avoir aucune influence sur la teneur en sélénium dans les urines.

5.1.4.3. Diurèse :

DIURESE	EFFECTIF	MOYENNE ($\mu\text{g/l}$)	ECART-TYPE
0 - 500	3	22,93	20,18
501-1.000	16	16,63	11,04
1.001-1.500	18	10,11	7,60
1.501-2.000	15	13,10	4,96
2.001-2.500	15	11,93	7,11
2.501-3.000	4	5,63	3,32
3.001-3.500	4	10,26	5,79
3.501-4.000	3	8,23	5,15
> 4.000	5	10,04	3,72

La détermination de coefficients de Student appliqués aux moyennes des quatre séries comprises entre 501 et 2.500 ml ne permet pas d'affirmer que l'excrétion urinaire du sélénium varie avec la diurèse. Pour le reste, les effectifs correspondant à chaque classe ne sont pas suffisants pour permettre de faire une interprétation statistique des résultats.

5.2. EXPERTISE TOXICOLOGIQUE -

D'après les résultats obtenus et sachant que la distribution suit la loi gaussienne, on ne peut confirmer, lors d'une expertise toxicologique, que la valeur obtenue relève d'une exposition professionnelle ou accidentelle au sélénium ou à l'un de ses dérivés tant que cette valeur ne dépasse les 28,7 µg/litre d'urine, et cela avec une précision de 95 % (seuil de sécurité de 0,05), ou encore mieux 36,93 µg/litre d'urine avec une précision de 99 % (seuil de sécurité de 0,01).

Nous avons réalisé le dosage du sélénium dans les urines provenant de 3 sujets supposés être intoxiqués au sélénium. Les teneurs calculées sont les suivantes :

SUJET	DIURESE (ml)	TENEUR µg/litre	DATE
1	800	25,4	04.04.1977
2	1.750	17,05	27.04.1977
3	-	28,4	27.04.1977

Les teneurs observées sont normales.

5.3. DOSAGE DU SELENIUM DANS LES HERBES ET LES MILIEUX BIOLOGIQUES -

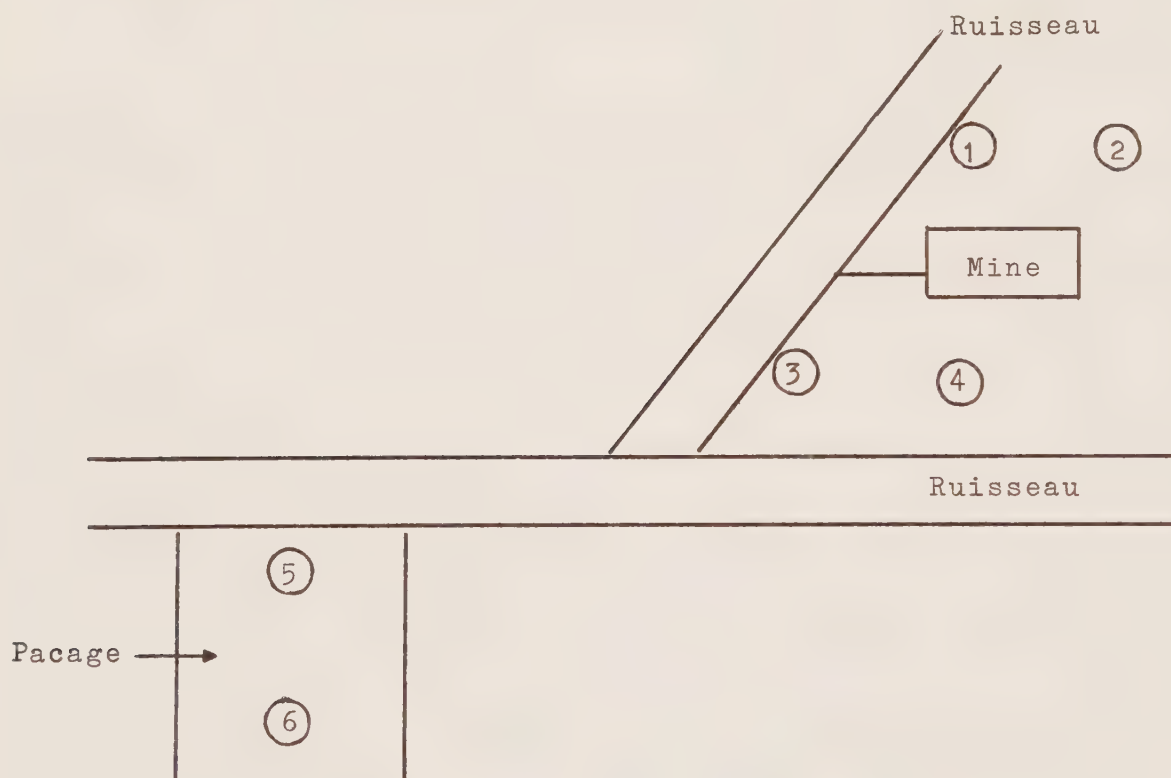
Il s'agit de prélèvements effectués par le service de Pharmacie-Toxicologie à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Ces prélèvements nous ont été expédiés le 28.03.1977. Les renseignements que nous possédons sont les suivants.

5.3.1. - Herbes :

Ces prélèvements ont été effectués aux alentours d'une mine riche en zinc. A la suite de débordements dans un ruisseau de cuves renfermant des eaux de lavage du minerai, une mortalité anormale a été observée dans un troupeau de moutons s'abreuvent dans ce ruisseau. Les accidents se sont produits en juin 1976, et l'intervention a été faite en novembre 1976. En réalité, les recherches effectuées au moment de la mortalité n'ont pas été suffisantes pour conclure à une intoxication, mais il y a eu très certainement des mortalités dues au relargage de plomb. La rémanence de certains éléments présents dans cette eau (Cd, Se, Pb) ont amené les toxicologues à rechercher si la végétation ne pouvait pas être actuellement contaminée (infiltration des eaux et contamination des plantes par le sol).

On trouve dans le graphique ci-après la géographie des lieux et les résultats correspondants : la pollution par la mine est certaine.

Seul le plomb présent dans l'herbe N° 5 pourrait être dangereux, mais les animaux ayant à leur disposition une pâture importante ne se nourriront pas uniquement dans cette zone contaminée.



- Les échantillons 1, 3 et 5, ont été prélevés en bordure des ruisseaux.
- Les échantillons 2, 4 et 6, à quelques dizaines de mètres de ceux-ci.

- RESULTATS :

N°	REFERENCE	PLOMB (mg/kg)		SELENIUM (mg/kg)	
		matière sèche	herbe fraîche	matière sèche	herbe fraîche
1	Bord amont....	140	44,0	0,224	0,070
2	Prairie amont.	50	14,9	0,096	0,029
3	Aval.....	2.100	1.380,7	2,121	1,39
4	Prairie aval..	100	28,2	0,1216	0,034
5	Bord.....	1.610	320,1	1,919	0,38
6	Prairie.....	85	28,2	0,126	0,042

5.3.2. - Echantillons de foie (485) :

Ils correspondent à des animaux qui appartenaient au troupeau ayant pâturé sur l'herbage 5 et 6 il y a plusieurs mois.

Les valeurs observées sont normales.

FOIE N°	SELENIUM (mg/kg) matière sèche
485 F ₃	0,520
485 F ₄	0,651
485 F ₅	0,580

5.3.3. - Echantillons de foie (548 et 538) :

Ces échantillons ont été transmis par des vétérinaires suspectant des intoxications au sélénium (étiologie accidentelle, surdosage médicamenteux) chez les moutons.

Le N° 538 renferme des quantités significatives d'une intoxication.

Les résultats concernant les foies 548 sont des valeurs normales et la suspicion est à rejeter.

FOIE N°	SELENIUM (mg/kg) matière sèche
538	14,27
548 F ₁	0,585
548 F ₂	0,447
548 F ₃	0,722

5.4. DOSAGE DU SELENIUM DANS LES EAUX -

Il s'agit de prélèvements effectués par le service des Eaux de l'Institut Pasteur de Lyon, à différents endroits. Les sites de prélèvement et les dates sont indiqués dans les pages qui suivent.

Les eaux sont :

- soit des eaux de boisson (eaux minérales, eaux provenant de certaines stations de pompage) ;
- soit des rejets industriels ;
- soit des eaux de rivière ;
- soit, enfin, des eaux de puits à usage particulier (Villefranche, Lyon) : puits utilisés par certaines blanchisseries ou par les Hospices Civils de Lyon.

Le nombre total de prélèvements est de 158, effectués entre le 1^{er} février 1977 et le 22 janvier 1978.

5.4.1. - Mise en place des observations :

Comme dans le cas des urines, nous avons dressé le tableau de distribution des fréquences. L'intervalle de classe est de 0,16 µg de sélénium.

5.4.2. - Représentation graphique :

Nous avons tracé l'histogramme de la distribution obtenue en portant en ordonnées les fréquences absolues relatives de chaque classe et en abscisses les teneurs en sélénium réparties en différentes classes.

5.4.3. - Caractéristiques :

Il s'agit d'une distribution en L.

Nous avons calculé la moyenne des teneurs observées dans nos prélèvements en appliquant la formule :

$$M = \frac{1}{N} \sum n_i X_i$$

où n_i est l'effectif de la classe i et X_i est la moyenne correspondante. N est le nombre total des observations.

$$M = 0,503 \text{ µg/litre.}$$

Il est à noter :

- qu'aucune des valeurs observées ne dépasse la valeur maximale admissible fixée par l'U.S. Department of Health et qui est de 10 µg par litre ;
- que la valeur la plus élevée est de 3,94 µg/litre, observée dans une eau de réfrigérant à Balan ;
- et que 50 % des teneurs mesurées ne dépassent pas 0,185 µg/litre.

CLASSE	FREQUENCE ABSOLUE	FREQUENCE RELATIVE	FREQUENCE CUMULEE
0 - 0,16	75	0,475	0,475
0,17 - 0,32	24	0,152	0,627
0,33 - 0,48	12	0,076	0,703
0,49 - 0,64	6	0,038	0,741
0,65 - 0,80	12	0,076	0,817
0,81 - 0,96	2	0,013	0,830
0,97 - 1,12	5	0,032	0,862
1,13 - 1,28	2	0,013	0,876
1,29 - 1,44	1	0,006	0,881
1,45 - 1,60	5	0,032	0,913
1,61 - 1,76	0	0	0,913
1,77 - 1,92	5	0,032	0,945
1,93 - 2,08	3	0,019	0,964
2,09 - 2,24	1	0,006	0,970
2,25 - 2,40	2	0,013	0,983
2,41 - 2,56	0	0	0,983
2,57 - 2,72	0	0	0,983
2,73 - 2,88	0	0	0,983
2,89 - 3,04	1	0,006	0,989
3,05 - 3,20	0	0	0,989
3,21 - 3,36	1	0,006	0,995
3,37 - 3,52	0	0	0,995
3,53 - 3,68	0	0	0,995
3,69 - 3,84	0	0	0,995
3,85 - 4,00	1	0,006	1,001

HISTOGRAMME de la distribution du SELENIUM dans les EAUX.



DATE	SITE DE PRELEVEMENT		TENEURS (µg/litre)
01.02.77	5.427	Eau de Nappe à BALAN	1,12
"	5.428	Eau de réfrigérant chez A.T.O. à BALAN	3,94
"	5.484	Puits des H.C.L.	0,77
"	5.485	Puits des H.C.L.	0,80
"	5.486	Station de pompage CHEIGNEU	<L.D.
"	5.487	Station de pompage BRENS	<L.D.
"	5.488	Station de pompage EGNIN	<L.D.
"	5.604	Station SAINT-GERMAIN-au-Mt-d'OR	<L.D.
"	5.605	Station POLEYMIEUX	0,41
"	5.606	Station CURIS	<L.D.
"	5.607	Station NEUVILLE	0,21
"	5.608	Station FLEURIEU	<L.D.
"	5.656	Furan à ANDREZIEUX	0,37
"	5.657	Loire à VEAUCHE	0,18
"	5.659	Loire à POUILLY	<L.D.
"	5.789	Station CENNES	0,25
"	5.790	Station MARCHAMPT	<L.D.
"	5.791	Station CENNES	0,49
"	5.792	Station MARCHAMPT	<L.D.
"	5.793	Station CENNES	0,30
"	5.794	Station MONSOLS	0,52
"	5.795	Station MONSOLS	0,61
"	5.796	Station MONSOLS	0,37
"	5.797	Station MONSOLS	0,45
"	5.798	Station SOUBRAN	0,35
"	5.799	Station St-JACQUES-des-ARETS	0,8
"	5.489	Station de pompage RIUS	1,9
"	5.490	Station de pompage PUGNIEU	<L.D.
"	5.491	Station de pompage CUZIEU	<L.D.
20.06.77	5.844	Isère à SAINT-GERVAIS	0,28
"	5.845	Puits 1 à VEUREY	0,25
"	5.846	Puits 2 à VEUREY	<L.D.
"	5.847	Puits 3 à VEUREY	0,20
"	5.848	Puits 4 à VEUREY	0,21

DATE	SITE DE PRELEVEMENT		TENEURS (µg/litre)
21.06.77	5.870	Source LA ROCHE - puits 2	0,37
"	5.871	Source LA ROCHE GRIFFON	0,28
"	5.929	Rhône PONT CARNOT	0,80
"	5.930	Rhône - lac du BOURGET	0,71
22.06.77	5.984	Rhône POINCARE	0,25
"	5.985	Saône COUZON	0,82
24.06.77	6.098	Réservoir d'eaux pluviales à VENISSIEUX	0,92
"	6.127	Puits à SAINT-VULBAS	0,45
28.06.77	6.200	Rhône à SAINT-VALLIER	0,47
"	6.199	Rhône à CHASSE	0,42
"	6.243	Sortie d'étang à VINCELLES	1,03
05.07.77	6.516	Station de pompage MONTAGNY	<L.D.
"	6.515	Station de pompage MILLERY	0,70
25.08.77	8.417	Eau minérale SAIL-les-ROMAINS	1,8
"	8.418	Eau minérale HAMEL	1,4
"	8.419	Eau minérale station ALBAN (GRIFFON)	2,2
"	8.420	Eau minérale ROCHE	2,4
29.08.77	8.497	Isère à SAINT-GERVAIS	1,0
03.09.77	8.632	Réfrigérant à BALAN	2,4
05.09.77	8.772	Station de pompage d'ANSE	1,6
"	8.773	Station de pompage SAINT-GEORGES	1,6
"	8.774	Station de pompage CHAMBOST-ALLIERES	1,6
"	8.775	Station de pompage LAMURE/AZERGUES	1,8
"	8.776	Aucune indication	1,0
13.09.77	9.054	Puits à VILLEFRANCHE	2,0
"	9.055	Puits à VILLEFRANCHE	0,4
"	9.056	Puits à VILLEFRANCHE	0,6
29.09.77	10.117	Eau minérale BRANLT GRIFFON	<L.D.
"	10.119	Eau minérale LA ROMAINE (réservoir)	<L.D.
"	10.122	Eau minérale SAINT-GEORGES GRIFFON	<L.D.
"	10.125	Eau minérale BADAT GRIFFON	<L.D.
"	10.128	Eau minérale CRISTAL GRIFFON	<L.D.
"	10.130	Eau minérale FEYZER GRIFFON	0,6

DATE	SITE DE PRELEVEMENT		TENEURS (μ g/litre)
05.10.77	10.398	Station FONTLAL N° 4	0,2
"	10.399	Station FONTLAL N° 5	0,2
"	10.400	Station FONTLAL N° 1	0,2
"	10.401	Station FONTLAL N° 2	<L.D.
"	10.402	Station FONTLAL N° 3	0,2
06.10.77	10.490	Station de CHASSE	0,8
"	10.507	Station de COMMELLE-VERNAY	0,6
"	10.508	Station SAINT-BONNET-des-QUARTS	<L.D.
"	10.491	Station VERNAY	0,8
10.10.77	10.629	Station de MASSIEUX	0,8
18.10.77	11.167	Emissaire lac du BOURGET	<L.D.
"	11.168	Rhône au PONT CARNOT	<L.D.
"	11.169	Saône à COUZON	0,24
"	11.180	Station de FLEURIEU	<L.D.
"	11.181	Station de NEUVILLE	<L.D.
"	11.182	Station de SAINT-GERMAIN-au-Mt-d'OR	<L.D.
"	11.183	Station POLEYMIEUX	<L.D.
"	11.184	Station CURIS	0,24
"	11.180	Rhône PONT POINCARE	<L.D.
19.10.77	11.261	Rhône SAINT-VALLIER	<L.D.
"	11.262	Rhône à CHASSE	0,24
"	11.263	Loire à VEAUCHE	<L.D.
"	11.265	Loire à POUILLY	<L.D.
"	11.266	FURAN	<L.D.
20.10.77	11.277	SAVINES-le-LAC	<L.D.
17.11.77	11.046	Isère à SAINT-GERVAIS	<L.D.
18.11.77	11.118	Rejet usine ANNECY	<L.D.
"	11.119	Rejet aval usine	<L.D.
"	11.120	Amont rejet	<L.D.
13.10.77	10.852	Nappe BALAN	<L.D.
"	10.853	Réfrigérant BALAN	<L.D.
24.10.77	11.370	Puits 1 LYON 7e	<L.D.
"	11.371	Puits 2 LYON 7e	<L.D.
"	11.372	Puits 3 LYON 7e	<L.D.

DATE	SITE DE PRELEVEMENT		TENEURS (µg/litre)
24.10.77	11.377	Eau de rivière ?	<L.D.
"	11.378	Eau de rivière ?	<L.D.
"	11.379	Décharge ouest SAINTE-AGATHE	<L.D.
"	11.380	Décharge est SAINTE-AGATHE	<L.D.
"	11.381	BEL AIN - SAINTE-AGATHE	<L.D.
"	11.382	BEL AIN - SAINTE-AGATHE P ^t 1374	<L.D.
"	11.383	BEL AIN - LA MAISON JAUNE	<L.D.
14.11.77	12.129	Station de BELLEVILLE	<L.D.
"	12.183	Isère à SAINT-GERVAIS	0,7
10.11.77	12.128	Station BEAUREGARD	0,34
14.11.77	12.216	Station de MONTAGNY	1,22
10.11.77	12.127	Station PENEY - VILLEURBANNE	0,38
15.11.77	12.290	Rhône PONT CARNOT	1,8
"	12.291	Emissaire lac du BOURGET	1,6
16.11.77	12.325	Furan à ANDREZIEUX	1,0
"	12.326	Loire à VEAUCHES	2,0
"	12.327	Loire à VILLERET	1,8
"	12.328	Loire à POUILLY	0,8
"	12.333	Rhône à SAINT-VALLIER	2,0
22.11.77	12.567	Saône à COUZON	3,0
"	12.568	Rhône PONT POINCARE	1,2
"	12.569	Rhône à CHASSE	0,8
23.11.77	12.592	Réfrigérant à BALAN	1,6
02.12.77	13.034	Puits raffinerie de FEYZIN	<L.D.
07.12.77	13.149	Station de LAMURE-sur-AZERGUES	<L.D.
"	13.150	Station CHAMBOST-ALLIERES	<L.D.
12.12.77	13.322	Isère à SAINT-GERVAIS	<L.D.
"	13.341	Puits THOLLET à SAINT-GALMIER	<L.D.
"	13.342	Puits HORME à SAINT-GALMIER	<L.D.
14.12.77	13.460	Furan à ANDREZIEUX	0,16
"	13.461	Loire à VEAUCHE	<L.D.
"	13.463	Loire à POUILLY	<L.D.

DATE	SITE DE PRELEVEMENT		TENEURS (µg/litre)
27.12.77	13.742	Station de BRIGNAIS	0,16
"	13.743	Station de MONTAGNY	<L.D.
"	13.750	Puits 3 LYON 7e	<L.D.
"	13.751	Puits 2 LYON 7e	<L.D.
"	13.752	Puits 1 LYON 7e	<L.D.
17.01.78	14.340	Station GRIGNY	0,40
"	14.341	Puits particulier H.C.L. à LYON	0,32
"	14.342	Rhône PONT POINCARE	0,24
"	14.343	Saône à COUZON	0,24
"	14.345	Rhône à SAINT-VALLIER	0,32
"	14.346	Rhône à CHASSE	0,32
"	14.356	Emissaire du lac du BOURGET	0,32
"	14.357	Rhône au PONT CARNOT	0,32
19.01.78	14.441	FURAN	<L.D.
"	14.442	Isère à SAINT-GERVAIS	<L.D.
"	14.444	Loire à VILLERET	<L.D.
20.01.78	14.482	Loire à POUILLY	<L.D.
"	13.598	Eau de réfrigérant à BALAN	<L.D.
"	13.599	Eau de nappe à BALAN	<L.D.
"	13.618	Rhône au PONT POINCARE	<L.D.
"	13.617	Saône à COUZON	<L.D.
"	13.620	Emissaire lac du BOURGET	<L.D.
"	13.621	Rhône PONT CARNOT	<L.D.
22.01.78	13.705	Rhône à SAINT-VALLIER	<L.D.
"	13.706	Rhône à CHASSE	<L.D.

C O N C L U S I O N

Une méthode de dosage du sélénium dans les urines a été mise au point, elle repose sur la formation d'un dérivé fluorescent entre le sélénium et le diamino-2,3-naphtalène. Une étude comparative avec la diamino-3,3' benzidine a été réalisée.

Des conditions optimales de pH, température et durée de minéralisation et de chauffage du reste perchlorique, ont été déterminées. Le rendement de la méthode a été évalué pour le sélénium minéral et ses métabolites organiques. La méthode permet le dosage de la quasi totalité du sélénium présent, la sensibilité est bonne et la limite de détection est de 0,39 µg/litre d'urine et de 0,16 µg/litre d'eau.

Dans les urines, une teneur moyenne de 12,3 µg/litre a été observée, les valeurs s'échelonnant entre 2,6 et 4 7 µg/litre. Aucune corrélation avec le pH, la diurèse et le sexe, n'a été observée.

Le domaine d'application a été étendu aux eaux. Les teneurs observées sont faibles et aucune des valeurs ne dépasse la teneur maximale admissible fixée par l'U.S. Department of Health et qui est de 10 µg/litre. Une teneur moyenne de 0,503 µg/litre a été observée, 50 % des valeurs n'ont pas dépassé 0,18 µg/litre et la valeur la plus élevée a été de 3,94 µg/litre.

B I B L I O G R A P H I E

1. ABE (T.), NAKAYA (R.) - The mechanism of the effectiveness of the selenite medium (or Salmonella).
- Jap. J. Bact., 1951, 6, 463-465, in C.A., 1954, 48, 9457 a.
2. ADAMS (R.F.), GILBERSTON (L.I.) -
- Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.), 1942, 14, 926, cité par ROQUEBERI (335).
3. AGDUHR (E.) - Changes in the organism caused by cod-liver oil added to the food.
- Acta paediat. scand. (Stockh.), 1927, 6, 165-179, cité par OKSANEN (293).
4. AKAGI (J.M.), CAMPBELL (L.) - Studies on thermophilic sulfate reducing bacteria. III - Adenosine triphosphate-sulfurylase of Clostridium nigrificans and Desulfovibrio desulfuricans.
- J. Bact., 1962, 84, 1194-1201.
5. AKIBA (M.), SHIMOISHI (Y.), TÔEI (K.) - The gas chromatographic determination of selenium in steel with 4-chloro-1,2-diaminobenzene.
- Analyst, 1975, 100, 648-654.
6. AKIBA (M.), SHIMOISHI (Y.), TÔEI (K.) - Gas chromatographic determination of selenium in pure elemental arsenic and arsenic III oxide with 4-nitro-1,2-diaminobenzene.
- Analyst, 1976, 101, 644-651.
7. ALBRIGHT (C.H.), BURKE (K.E.), YANAK (M.M.) - Chemical concentration, X-ray determination of selenium in copper, nickel and iron-base alloys.
- Talanta, 1969, 16 (3), 309-313.
8. ALBRIGHT (S.D.), HITCH (J.M.) - Rapid treatment of tinea versicolor with selenium sulfide.
- Arch. Derm., 1966, 93 (4), 460-462.
9. ALLAN (J.E.) - Atomic absorption spectrophotometry absorption lines and detection limits in the air-acetylene flame.
- Spectrochim. Acta, 1962, 18, 259-263, cité par WATKINSON (437).

10. ALLAWAY (W.H.), CARY (E.E.) - Determination of submicrogram amounts of selenium in biological materials.
- *Analyt. Chem.*, 1964, 36 (7), 1359-1362.
11. ALLAWAY (W.H.), CARY (E.E.), EHLIG (C.F.) - The cycling of low levels of selenium in soils, plants and animals.
- In MUTH (O.H.) (Ed.), *Selenium in Biomedicine*. Avi. Pub. Co, Westport, Connecticut, 1967, 273-296.
12. ALLAWAY (W.H.), KUBOTA (J.), LOSEE (F.), ROTH (M.) - Selenium, molybdenum and vanadium in human blood.
- *Arch. environm. Hlth*, 1968, 16, 342-348.
13. AMDUR (M.L.) -
- *Occup. Med.*, 1947, 2, 386, cité par LACASSE (216).
14. AMOR (A.J.), PRINGLE (P.) - A review of selenium as an industrial hazard.
- *Bull. Hyg.*, 1945, 20 (5), 239-241.
15. ANDREESSEN (J.R.), SCHAUPP (A.), NEURAUTER (C.), BROWN (A.), LJUNDAHL (L.G.) - Fermentation of glucose, fructose and xylose by *clostridium thermoaceticum*, and the synthesis of acetate from carbon dioxide.
- *J. Bact.*, 1973, 114 (2), 743-751.
16. ANDREWS (R.W.), JOHNSON (D.C.) - Voltametric deposition and stripping of selenium IV at a rotating gold-disk electrode in 0.1 M perchloric acid.
- *Analyt. Chem.*, 1975, 47 (2), 294-299.
17. ANDREWS (R.W.), JOHNSON (D.C.) - Determination of selenium IV by anodic stripping voltametry in flow system with ion exchange separation.
- *Analyt. Chem.*, 1976, 48 (7), 1056-1060.
18. ANONYME - Toxicologie industrielle du sélénium.
- *Cah. Notes document. Sécur. Hyg. trav.*, 1971, 63, 187-192.
19. ARONOW (L.), KERDEL-VEGAS (F.) - Cytotoxic and depilatory effects of extracts of *Lecythis Ollaria*.
- *Nature*, 1965, 205, 1185-1186.
20. ATERMAN (K.) - Selenium liver necrosis and depigmentation of incisors in the rat.
- *Brit. J. Nutr.*, 1959, 13, 38-41.
21. AWASTHI (Y.C.), BEUTLER (E.), SRIVASTAVA (S.K.) - Purification and properties of human erythrocyte glutathione-peroxidase.
- *J. Biol. Chem.*, 1975, 250 (13), 5144-5149.

22. BACIGALUPO (F.A.), CULIK (R.), LUECKE (R.W.), THORP (F.) - Further studies on vitamin E deficiency in the lamb.
- J. anim. Sci., 1952, 11, 609-620, in C.A., 1953, 47, 2842 d.
23. BAIRD (R.B.), SOULOUKID (P.), GABRIELIAN (S.M.) - Determination of trace amounts of selenium in waste waters by carbon rod atomisation.
- Analyt. Chem., 1972, 44 (11), 1887-1889.
24. BALANDINA (N.S.), VUDELEVICH (I.G.), KHRAPAI (V.P.), ABAKUMOV (D.N.) - (Atomic-absorption determination of selenium and tellurium in pure gold).
- Zh. Anal. Khim., 1973, 28 (10), 2054-2056 (Russ.), in C.A., 1974, 80, 77968 F.
25. BEAL (A.R.) - Selenium determination in fish tissue.
- J. fish. Res. Board can., 1975, 32 (2), 249-252.
26. BEATH (O.A.), EPPSON (H.F.), GILBERT (C.S.) - Selenium and other toxic minerals in soils and vegetation.
- Wyoming Agr. Expt. sta. Bull. N° 206, 1, 1935, cité par OSBURN (R.), the determination of selenium, Louisiana state University, Ph. D., 1969.
27. BECKURT -
- Arch. Pharm., 1902, 240, 656, cité par ROQUEBERT (335).
28. BEL (A.), LEVRAT (R.), NESMOZ (J.), GILARD (M.) - Les lésions hépatiques de l'intoxication chronique au sélénium chez le rat.
- J. Méd. Lyon, 1966, numéro spécial, 53-64.
29. BETTERIDGE (D.) - Determination of selenium in hair by neutron-activation analysis.
- At. Energy Res. Estab. (Gt. Brit.), Rept. R 4881, in Analyt. Abst., 1965, 12, 6592.
30. BEUTLER (E.), BEUTLER (B.), MATSUMOTO (F.) - Glutathione peroxidase activity of inorganic selenium and seleno D.L. cysteine.
- Experientia, 1975, 31 (7), 769-770.
31. BILHEIMER (D.), EISENBERG (S.), LEVY (R.I.) - The metabolism of very low density lipoprotein proteins I. Preliminary in vitro and in vivo observations.
- Biochim. biophys. Acta, 1972, 260, 212-221.
32. BLAU (M.) - Biosynthesis of ⁷⁵-Se selenomethionine and ⁷⁵-Se selenocystine.
- Biochim. biophys. Acta, 1961, 49, 389-390.

33. BLAXTER (K.L.) - Myopathic conditions in animals.
- Vet. Rec., 1957, 69, 1150-1157, cité par OKSANEN (293).
34. BLINCOE (C.), DYE (W.B.) - Serum transaminase in white-muscle disease.
- J. anim. Sci., 1958, 17, 224-226.
35. BONHORST (C.W.) - Anion antagonisms in yeast as indicators of the mechanism of selenium toxicity.
- J. Agr. Food chem., 1955, 3, 700-703, cité par SHRIFT (386).
36. BONHORST (C.W.), MATTICE (J.J.) -
- Analyt. Chem., 1959, 31, 2106, cité par ROQUEBERT (335).
37. BOWEN (J.) -
- J. Irish Dent. Ass., 1972, 18, 83, cité par HADJIMARKOS (151).
38. BOWEN (J.M.), CAWSE (P.A.) - The determination of selenium in biological material by radioactivation.
- Analyst, 1963, 88, 721-726.
39. BRENNER (W.) - Experiments on the cultivation of a slime bacterium on selenium containing culture media.
- Jahrb. Wiss. Bot., 1916, 57, 95-127, cité par SHRIFT (386).
40. BROWN (D.G.), BURK (R.F.) - Selenium retention in tissues and sperm of rats fed a torula yeast diet.
- J. Nutr., 1973, 103 (1), 102-108.
41. BROWN (R.S.) - Spectrophotometric determination of Se IV with diamino chrysazine.
- Analyt. Chim. Acta, 1975, 74 (2), 441-445.
42. BROWNING (E.) - Toxicology of organic compounds of industrial importance.
- Elsevier Pub. Co, London, 1961, 252-261.
43. BUCHAN (R.F.) - Industrial selenosis. A review of literature, report of five cases and a general bibliography.
- Occup. Med., 1947, 3, 439-456, cité par KLEVAY (211).
44. BURGETT (C.A.) - Gas chromatography of selenium as the trimethyl silyl derivative.
- Analyt. Lett., 1974, 7 (12), 799-806, in C.A., 1975, 83, 21442 z.
45. BURK (R.) - In vivo ⁷⁵-Se binding to human plasma proteins after administration of selenium (Se⁷⁵).
- Biochim. biophys. Acta, 1974, 372 (2), 255-265.

46. BURK (R.F.), BROWN (D.G.), SEELY (R.J.), SCAIEF (C.C.) - Influence of dietary and injected selenium on whole body retention, route of excretion and tissue retention of $^{75}\text{-SeO}_3^{--}$ in the rat.
- J. Nutr., 1972, 102 (8), 1049-1059.
47. BURK (R.F.), PEARSON (W.N.), WOOD (R.P.), VITERI (F.) - Blood selenium levels and in vitro red blood cell uptake of $^{76}\text{-Se}$ in kwashiorkor.
- Amer. J. clin. Nutr., 1967, 20, 723-733.
48. BURK (R.F.), SEELY (R.J.), KIKER (K.W.) - Selenium : dietary threshold for urinary excretion in the rat.
- Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1973, 142 (1), 214-216.
49. BURTON (V.), KEELER (R.F.), SWINGLE (K.F.), YOUNG (S.) - Nutritional muscular dystrophy in lambs, selenium analysis of maternal, fetal and juvenile tissues.
- Amer. J. vet. Res., 1962, 23, 962-965, cité par WRIGHT (452).
50. BUSEV (A.I.), MIN-TIAO (H.) - (Benzimidazolethiol as a reagent for selenium).
- Zh. Anal. Khim., 1962, 17, 1091-1095 (Russ.), in C.A., 1963, 58, 11953 d.
51. BUSEV (A.I.), MIN-TIAO (H.) - (1,phenyl thiosemicarbazide as a reagent for selenium).
- Zh. Anal. Khim., 1963, 18 (11), 1370-1374 (Russ.), in C.A., 1964, 60, 6210 e.
52. BUTLER (G.W.), PETERSON (P.J.) - Uptake and metabolism of inorganic forms of selenium-75 by Spirodela oligorrhiza.
- Austr. J. Biol. Sci., 1967, 20, 77-86, cité par ALLAWAY (11).
53. BUTTNER (W.) - Action of trace elements on the metabolism of fluoride.
- J. Dent. Res., 1963, 42, 453, cité par HADJIMARKOS (151).
54. BYARD (J.L.) - Trimethyl selenide. A urinary metabolite of selenite.
- Arch. Biochem. Biophys., 1969, 130, 556-560.
55. CALDWELL (J.S.), LISHKA (R.J.), McFARREN (E.F.) - Evaluation of a low cost arsenic and selenium determination at microgram per liter levels.
- J. Amer. Water Works Ass., 1973, 65 (11), 731-735, in C.A., 1974, 80, 74176 k.
56. CALDWELL (K.A.), TAPPEL (A.L.) - Reactions of seleno and sulfo amino acids with hydroperoxides.
- Biochemistry, 1964, 3, 1643-1647.

57. CALDWELL (K.A.), TAPPEL (A.L.) - Acceleration of sulfhydryl oxidations by selenocystine.
- Arch. Biochem. Biophys., 1965, 112, 196-200.
58. CALEY (R.), HENDERSON (C.L.) -
- Analyt. Chem., 1960, 32, 975, cité par ROQUEBERT (335).
59. CAROLI (J.), MILHAUD (G.), de SAINT-LAURENT (J.E.),
HADCHOUEL (P.), THEDDOROPOULOS (G.) - Méthode originale
de diagnostic des cancers du foie : la scintigraphie à
la sélénométhionine.
- Ann. Méd. interne, 1971, 122 (6-7), 747-754.
60. CARTER (R.F.) -
- Med. J. Austr., 1966, i, 525, cité par POLSON (C.J.),
TATTERSALL (R.N.), Clinal Toxicology, 2nd Ed.,
Lippincott, Philadelphia, 1969, 326-329.
61. CARY et al. - Reactions of selenite-selenium added to soils
that produce low selenium forages.
- Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 1967, 31, 21-26, cité par
ALLAWAY (11).
62. CENTURY (B.), HORWITT (M.K.) - Effect of dietary selenium
on incidence of nutritional encephalomalacia in chicks.
- Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1964, 117 (1), 320-322.
63. CERWENKA (E.A.), COOPER (W.C.) - Toxicology of selenium and
tellurium and their compounds.
- Arch. environm. Hlth, 1961, 3, 189-200.
64. CERWENKA (R.), KORBORA (M.) - Polarographic determination
of selenium in water.
- Chem. Listy, 1955, 49, 1158-1161, in C.A., 1955, 49,
14566 b.
65. CHAKRABARTI (C.L.) - Atomic absorption spectroscopy of
selenium.
- Analyt. Chim. Acta, 1968, 42 (3), 379-387, in C.A.,
1968, 69, 56790 z.
66. CHAMBERS (J.C.), Mc CLELLAN (B.E.) - Enhancement of atomic
absorption sensitivity for copper, cadmium, antimony,
arsenic and selenium, by means of solvent extraction.
- Analyt. Chem., 1976, 48 (14), 2061-2066.
67. CHAN (F.L.) - 4,5-diamino-6-thiopyrimidine as an analytical
reagent. I - Spectrophotometric determination of selenium.
- Talanta, 1964, 11 (7), 1019-1029, in C.A., 1964, 61,
2475 f.

68. CHAU (Y.K.), WONG (P.T.S.), SILVERBERG (B.A.), LUXON (P.L.), BENGERT (G.A.) - Methylation of selenium in the aquatic environment.
- Science, 1976, 192, 1130-1131.
69. CHENG (K.L.) - Determination of traces of selenium 3,3'-diaminobenzidine as selenium IV organic reagent.
- Analyt. Chem., 1956, 28 (11), 1738-1742.
70. CHRISTENSEN (F.), DAM (H.), PRANGE (I.), SONDERGAARD (E.) - The effect of selenium on vitamin E deficient rats.
- Acta pharmacol. toxic., 1958, 15, 181-188.
71. CHRISTIAN (G.D.), KNOBLOCK (E.C.), PURDY (W.C.) - Polarographic determination of selenium in biological materials.
- J. Assoc. off. Agr. Chemists, 1965, 48, 877-884.
72. CLAYCOMB (C.K.), SORENSON (F.M.), GATEWOOD (D.C.), JUMP (E.B.), WEAVER (M.E.) - Presence of selenium-75 in rat saliva and teeth after intracardiac injection of radioactive sodium selenite.
- J. Dent. Res., 1961, 40, 504-510, cité par KLEVAY (211).
73. CLAYTON (C.C.), BAUMANN (C.A.) - Diet and azo dyes tumors : effect of diet during a period when the dye is not fed.
- Cancer Res., 1949, 9, 575-582.
74. CLINTON (M. Jr) -
- J. Ind. Hyg. Toxicol., 1947, 29, 225, cité par BROWNING (42).
75. COHEN (Y.), MERLIN (L.), LAMBER (F.), MARTINELLI (M.), BRUNEAU (J.) - Kinetics of selenomethionine 75-Se in the rat.
- Recent Adv. Nucl. Med. Proc. World. Cong. Nucl. Med., 1st 1974, 879-881.
76. COLELLA (A.C.), PIGORINI (F.) - Experiences in pancreas scanning using 75-Se selenomethionine.
- Brit. J. radiol., 1967, 40, 662-669.
77. COLEMAN (W.C.), Mc CROSKY (C.R.) -
- Ind. Eng. Chem. (Analyt. Ed.), 1937, 9, 431, cité par ROQUEBERT (335).
78. COLES (L.E.) - Selenium : a review.
- J.A.P.A., 1974, 12, 68-72.
79. CONE (J.E.), MARTIN DEL RIO (R.), DAVIS (J.N.), STADTMAN (T.C.) - Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase : identification of selenocysteine as the organoselenium moiety.
- Proc. nat. Acad. Sci., 1976, 73 (8), 2659-2663, in C.N.R.S., 1977, 320, 2474.

80. COOPER (W.C.) - Selenium toxicity in man.
- In MUTH (O.H.) (Ed.), Selenium in Biomedicine, Avi. Pub. Co, Westport, Connecticut, 1967, 185-199.
81. CUMMINGS (L.M.), KIMURA (E.T.) - Safety evaluation of selenium sulfide antidandruff shampoos.
- Toxicol. appl. Pharmacol., 1971, 20, 89-96.
82. CUMMINGS (L.M.), MARTIN (J.L.), MAAG (D.D.) - An improved method for determination of selenium in biological material.
- Analyt. Chem., 1965, 37 (3), 431-432.
83. DAM (H.) - Studies on vitamin E deficiency in chicks.
- J. Nutr., 1944, 27 (2), 193-211.
84. DAM (H.), GLAVIND (J.) - Alimentary exudative diathesis.
- Nature, 1938, 142, 1077, cité par SONDERGAARD (396).
85. DAM (H.), NIELSEN (G.K.), PRANGE (I.), SONDERGAARD (E.) - The exudative diathesis produced by Torula yeast.
- Experientia, 1957, 13 (12), 493-494.
86. DAM (H.), NIELSEN (G.K.), PRANGE (I.), SONDERGAARD (E.) - Exudative diathesis produced by vitamin E-deficient diets without polyenoic fatty acids.
- Experientia, 1958, 14 (8), 291-292.
87. DAM (H.), SONDERGAARD (E.) - Prophylactic effect of selenium oxide against degeneration (white striation) of muscles in chicks.
- Experientia, 1957, 13 (12), 494.
88. DANILENKO (E.F.), USATENKO (Y.I.), VOLVANOV (S.K.), TSYGULEVA (N.I.) - (Amperometric determination of Se IV by unithiol).
- Vopr. Khim. Tekhnol., 1974, 33, 77-81 (Russ.), in C.A., 1975, 83, 52818 f.
89. DEBRUN (J.L.), BARRADON (J.N.), BENABEN (P.) - Irradiation of elements from $z = 3$ to $z = 42$ with 10-Mev protons and application to activation analysis.
- Analyt. Chem., 1976, 48 (1), 167-172.
90. DEMEYERE (D.), HOSTE (Y.) - O-diamines as a reagent for selenium. I - 4-dimethyl amino-O-phenylène diamine.
- Analyt. Chim. Acta, 1961, 27, 288-294, in C.A., 1962, 57, 14431 C.
91. DENNIS (B.L.), MOYERS (J.L.), WILSON (G.S.) - Determination of selenium as selenide by differential pulse cathodic stripping voltametry.
- Analyt. Chem., 1976, 48 (11), 1611-1616.

92. DESALAS (S.M.) - (Selenium in water. III - Content of selenium in some argentina waters).
- Revista de Obras Sanitarias de la nacion, 1947, 120, 21-24, cité par LAKIN (218)
93. DICKSON (R.C.), TOMLINSON (R.H.) - Selenium in blood and human tissues.
- Clin. chim. Acta, 1967, 16, 311-321.
94. DINGWALL (D.), WILLIAMS -
- J. Pharm. Pharmacol., 1961, 13, 12, cité par ROQUEBERT (335).
95. DIPLOCK (A.T.), EDWIN (E.E.), BUNYAN (J.), GEEN (J.) - The effect of tocopherol, vitamin A, selenium and antioxidants on ubiquinone in the rat.
- Brit. J. Nutr., 1961, 15, 425-441.
96. DOLEZAL (J.), CADEK (J.) - Determination of small amounts of selenium in pyrites and similar material.
- Chem. Listy, 1955, 49, 1152-1157, in C.A., 1955, 49, 14566 c.
97. DOMENECH (R.) - Détection et dosage des traces de sélénium dans les colorants pour usages alimentaires.
- Chimie Analytique, 1969, 51 (9), 440-443.
98. DUBOIS (K.P.), MOXON (A.L.), OLSON (O.E.) - Further studies on the effectiveness of arsenic in preventing selenium poisoning.
- J. Nutr., 1940, 19, 477-482, in C.A., 1940, 34, 4801-4808.
99. DUDLEY (H.C.) -
- Amer. J. Hyg., 1936, 23, 281, cité par GLOVER (134).
100. DUDLEY (H.C.) - Toxicity of selenium. V - Toxic and vesicant properties of selenium oxychloride.
- Publ. Hlth. Rep., 1938, 53, 94-98, cité par KLEVAY (211).
101. DUDLEY (H.C.), MILLER (J.W.) - Toxicology of selenium. VI - Effects of subacute exposure to hydrogen selenide.
- J. ind. Hyg. Toxic., 1941, 23, 470-477, cité par KLEVAY (211).
102. DUMAS (J.) - Contribution à l'étude du syndrome myopathie - dyspnée des veaux de lait. Sa prophylaxie par le sélénium et ses sels.
- Thèse Méd. Vét. Lyon, 1962, N° 22.
103. DUMERY (P.R.) - Le sélénium, agent antimycosique.
- La Presse Médicale, 1953, 61 (80), 1646.

104. DUVOIR (M.), POLLET (L.), HERRENSCHMIDT (J.L.) - Eczéma professionnel dû au sélénium et déclenché par la reprise du travail après un arrêt prolongé.
- Bull. Soc. franç. Derm. Syph., 1937, 44, 88-95.
105. DYE (W.B.), BRETHAUER (E.), SEIM (H.J.), BLINCO (C.) - Fluorimetric determination of selenium in plants and animals with 3,3'-diaminobenzidine.
- Analyt. Chem., 1963, 35 (11), 1687-1693.
106. EARL (H.L.) - Determination of selenium in water and industrial effluents by flameless atomic absorption.
- Analyt. Chem., 1975, 47 (3), 428-432.
107. ELKINS (H.B.) - The Chemistry of industrial toxicology.
- WILEY, New York, 1950, cité par GLOVER (134).
108. EMMEL (V.M.) - Studies on the kidney in vitamin E deficiency.
- J. Nutr., 1957, 61 (1), 51-65.
109. ERMAKOV (V.V.) - Materials on the distribution of selenium in human organs and tissues.
- Exp. Biol. Med., 1963, 59 (3), 283-284, cité par FULLER (123).
110. EVANS (C.S.), ASHER (C.J.), JOHNSON (C.M.) - Isolation of dimethyl-diselenide and other volatile selenium compounds from *Astragalus racemosus*.
- Austr. J. Biol. Sci., 1968, 21 (1), 13-20, in C.A., 1968, 68, 102523 u.
111. EWAN (R.C.), POPE (A.L.), BAUMANN (A.) - Elimination of fixed selenium by the rat.
- J. Nutr., 1967, 91 (4), 547-554.
112. FALCONE (G.), NICKERSON (W.J.) - Reduction of selenite in intact yeast cells and cell-free preparations.
- J. Bact., 1963, 85, 754-762.
113. FEIGL (F.), WEST (P.W.) - Test for selenium based on catalytic effect.
- Analyt. Chem., 1947, 19, 351-353.
114. FELS (I.G.), CHELDELIN (V.H.) - Selenate inhibition studies. III - The reversal of selenate inhibition in *E. coli*.
- Arch. Biochem., 1949, 22, 402-405, cité par SHRIFT (386).
115. FIORINO (J.A.), JONES (J.W.), CAPAR (S.G.) - Sequential determination of arsenic, selenium, antimony and tellurium in foods via rapid hydride evolution and atomic absorption spectrometry.
- Analyt. Chem., 1976, 48 (1), 120-125.

116. FLEMING (H.D.), IDE (R.G.) - Determination of volatile hydride-forming metals in steel by atomic absorption spectrometry.
- *Analyt. Chim. Acta*, 83 (1), 67-82, in *C.A.*, 1976, 85, 116188 b.
117. FLEMING (R.W.), ALEXANDER (M.) -
- *Appl. Microbiol.*, 1972, 24, 424, cité par CHAU (68).
118. FLOHE (L.), GUENZIER (H.E.), SCHOCK (H.H.) - Glutathione peroxidase : a selenoenzyme.
- *F.E.B.S. lett.*, 1973, 32 (1), 132-134.
119. FODOR (G.), KEMENY (G.L.) - On the hepato-protective effect of selenium in carbon tetrachloride poisoning in albino rats.
- *Experientia*, 1965, 21 (11), 666-667.
120. FRANKE (K.W.), MOXON (A.L.) - A comparison of the minimum fatal doses of selenium, tellurium, arsenic and vanadium.
- *J. Pharmacol. Exp. therap.*, 1936, 58, 454-459.
121. FRIEDEL (H.L.), Mc INTYRE (W.J.), REJALI (A.N.) - A method for visualisation of the configuration and structure of the liver.
- *Amer. J. Roentgenol.*, 1957, 77, 455-470.
122. FROST (D.V.), LISH (P.M.) - Selenium in biology.
- *Ann. Rev. Pharmacol.*, 1975, 15, 259-284.
123. FULLER (J.M.), BECKMAN (E.D.), GOLDMAN (M.), BUSTAD (L.K.) - Selenium determination in human and swine tissues by X-ray emission spectrometry.
- in MUTH (O.H.) (Ed.), *Selenium in Biomedicine*, Avi. Pub. Co, Westport, Connecticut, 1967, 119-124.
124. GABBEDY (B.J.) - Toxicity in sheep associated with the prophylactic use of selenium.
- *Austr. vet. J.*, 1970, 46, 223-226.
125. GABBEDY (B.J.), DICKSON (J.) - Acute selenium poisoning in lambs.
- *Austr. vet. J.*, 1969, 45, 470-472.
126. GANTHER (H.E.) - Enzymic synthesis of dimethyl selenide from sodium selenite in mouse liver extracts.
- *Biochemistry*, 1966, 5 (3), 1089-1098.
127. GANTHER (H.E.) - Selenotrisulfides. Formation by the reaction of thiols with selenious acid.
- *Biochemistry*, 1968, 7 (8), 2898-2905.

128. GANTHER (H.E.) - Reduction of the selenotrisulfide derivative by glutathione to a persulfide derivative by glutathione reductase.
- Biochemistry, 1971, 10 (22), 4089-4098.
129. GANTHER (H.E.), BAUMANN (C.A.) - Selenium metabolism.
I - Effects of diet, arsenic and cadmium.
- J. Nutr., 1962, 77 (2), 210-216.
130. GANTHER (H.E.), GOUDIE (C.), SUNDE (M.L.), KOPECKY (M.Y.), WAGNER (P.), OH (S.H.), HOEKSTRA (W.G.) - Selenium : relation to decreased toxicity of methyl mercury added to diets containing tuna.
- Science, 1972, 175, 1122-1124.
131. GANTHER (H.E.), HSIEH (H.) - Mechanisms for the conversion of selenite to selenide in mammalian tissues. Trace elements metabolism in animals, 2. Proc. Int. Symp., 1974, 339-353.
132. GARTON (G.A.), DUNCAN (W.R.H.), BLAXTER (K.L.), Mc GILL (R.F.), SHARMAN (G.A.M.), HUTCHESON (M.K.) - Muscular dystrophy of beef, cattle and unsaturated fats.
- Nature, 1956, 177, 792-793.
133. GLENN (M.W.), MARTIN (J.L.), CUMMINS (L.M.) - Sodium selenate toxicosis : the distribution of selenium within the body after prolonged feeding of toxic quantities of sodium selenate to sheep.
- Amer. J. vet. Res., 1964, 25, 1495-1499.
134. GLOVER (J.R.) - Selenium in human urine : a tentative maximum allowable concentration for industrial and rural populations.
- Ann. occup. Hyg., 1967, 10 (1), 3-14.
135. GLOVER (J.R.) - Selenium and its industrial toxicology.
- Industr. Med., 1970, 39 (1), 50-54.
136. GOLDSCHMIDT (V.M.) - Geochemistry.
- Oxford University press, London, 1954, cité par LAKIN (218).
137. GOLDSTEIN (J.), SCOTT (M.L.) - An electrophoretic study of exudative diathesis in chicks.
- J. Nutr., 1956, 60 (3), 349-359.
138. GOULDEN (P.D.), BROOKSBANK (P.) - Automated atomic absorption determination of As, Sb and Se in natural waters.
- Analyt. Chem., 1974, 46 (11), 1431-1436.
139. GRANADOS (H.), DAM (H.) - Inhibition of pigment deposition in incisor teeth of rats deficient in vitamin E from birth.
- Proc. exp. Soc. Biol. Med., 1945, 59 (2), 295-296.

140. GRANADOS (H.), DAM (H.) - Role of fat in incisor depigmentation of vitamin E deficient rats.
- Science, 1945, 101, 250-251.
141. GRANT (A.B.), WILSON (G.F.) - Selenium content of milk from cows given sodium selenate.
- N. Z. J. Agr. Res., 1968, 11 (3), 733-736.
142. GRANT (C.A.), THAFVELIN (B.), CHRISTELL (R.) - Retention of selenium by pig tissues.
- Acta pharmacol. toxic., 1961, 18, 285-297, cité par WATKINSON (437).
143. GREEN (J.), DIPLOCK (A.T.), BUNYAN (J.), EDWIN (E.E.), Mc HALE (D.) - Ubiquinone (coenzyme Q) and the function of vitamin E.
- Nature, 1961, 190, 318-325.
144. GUNIN (S.A.), GOULD (T.C.) - Specificity of response in relation to cadmium, zinc and selenium.
- In MUTH (O.H.) (Ed.), Selenium in Biomedicine, Avi. Pub. Co, Westport, Connecticut, 1967, 395-413.
145. GUNN (S.A.), GOULD (T.C.), ANDERSON (W.A.D.) - Incorporation of selenium into spermatogenic pathway in mice.
- Proc. exp. Soc. Biol. Med., 1967, 124 (4), 1260-1263.
146. HADJIMARKOS (D.M.) - Selenium content of human milk : possible effect on dental caries.
- J. Pediat., 1963, 63, 273-275.
147. HADJIMARKOS (D.M.) - Effect of selenium in dental caries.
- Arch. environm. Hlth, 1965, 10, 893-899.
148. HADJIMARKOS (D.M.) - Trace elements in public water supplies and dental caries.
- Arch. environm. Hlth, 1966, 13, 102-104.
149. HADJIMARKOS (D.M.) - Effect of selenium and type of diet on the pattern of food and water intake in the rat.
- Experientia, 1967, 23 (11), 930-932.
150. HADJIMARKOS (D.M.) - Selenium toxicity : effect of fluoride.
- Experientia, 1969, 25 (5), 485-486.
151. HADJIMARKOS (D.M.) - Selenium in relation to dental caries.
- Food Cosmet. Toxic., 1973, 11, 1083-1095.
152. HAHN (H.), KLEINWORTH (W.) - (An indirect polarographic method for the determination of microquantities of selenium).
- Z. Analyt. Chem., 1956, 151, 98-104 (Russ.), in C.A. 1956, 50, 10602 g.

153. HALL (R.J.), GUPTA (P.L.) - The determination of very small amounts of selenium in plant samples.
- Analyst, 1969, 94, 292-299.
154. HALVERSON (A.W.) - Development of hemolytic anemia in rats fed selenite.
- Toxicol. appl. Pharmacol., 1970, 17, 151-159.
155. HALVERSON (A.W.) - Growth and reproduction with rats fed selenite-Se. Trace elements metabolism in animals,
2. Proc. Int. Symp., 1974, 587-589.
156. HALVERSON (A.W.), MONTY (K.J.) - An effect of dietary sulfate on selenium poisoning in the rat.
- J. Nutr., 1960, 70 (1), 100-102.
157. HAMILTON (J.W.), BEATH (O.A.) - Amount and chemical form of selenium in vegetable plants.
- J. Agr. Food Chem., 1964, 12, 371-374, cité par JOHNSON (199).
158. HAMILTON (J.W.), TAPPEL (A.L.) - Lipid antioxydant activity in tissues and proteins of selenium-fed animals.
- J. Nutr., 1963, 79 (4), 493-502.
159. HANDLEY (R.) - Fluorescent X-ray determination of selenium in plant material.
- Analyt. Chem., 1960, 32 (12), 1719-1720.
160. HANDLEY (R.), JOHNSON (C.M.) -
- Analyt. Chem., 1959, 31, 2105, cité par ROQUEBERT (335).
161. HANSSON (E.), JACOBSSON (S.O.) - Uptake of selenomethionine ⁷⁵-Se in the tissues of the mouse studied by whole-body autoradiography.
- Biochim. Biophys. Acta, 1966, 115 (2), 285-293.
162. HARR (J.R.), BONE (J.F.), TINSLEY (I.J.), WESWIG (P.H.), YAMAMOTO (R.S.) - Selenium toxicity in rats. II - Histopathology.
- In MUTH (O.H.) (Ed.), Selenium in Biomedicine, Avi. Pub. Co, Westport, Connecticut, 1967, 153-178.
163. HARR (J.R.), EXON (J.H.), WHANGER (P.D.), WESWIG (P.H.) - Effect of dietary selenium on N,2-fluorenyl-acetamide (F.A.A.) induced cancer in vitamin E supplemented selenium depleted rats.
- Clin. Toxic., 1972, 5 (2), 187-194.
164. HARR (J.R.), MUTH (O.H.) - Selenium poisoning in domestic animals and its relationship to man.
- Clin. Toxic., 1972, 5 (2), 175-186.

165. HARRIS (P.L.), LUDWIG (M.L.), SCHWARZ (K.) - Ineffectiveness of factor 3-active selenium compounds in resorption-gestation bioassay for vitamin E.
- Proc. exp. Soc. Biol. Med., 1958, 97 (3), 686-688.
166. HARTLEY (W.J.), GRANT (A.B.) - A review of selenium responsive diseases of New Zealand livestock.
- Fed. Proc., 1961, 20, 679-688.
167. HASHIMOTO (Y.), HWANG (J.Y.), YANAGISAWA (S.) - Possible source of atmospheric pollution of selenium.
- Environm. Sci. Technol., 1970, 4 (2), 157-158, in C.A., 1970, 72, 47073 c.
168. HASHIMOTO (Y.), WINCHESTER (J.W.) - Selenium in the atmosphere.
- Environm. Sci. Technol., 1967, 1 (4), 338-340, in C.A., 1967, 66, 117865 q.
169. HAYNIE (T.P.), OTTE (W.K.), WRIGHT (J.C.) - Visualization of a hyperfunctioning parathyroid adenoma using ⁷⁵-Se selenomethionine and the photoscanner.
- J. Nucl. Med., 1964, 5, 710-714, cité par KLEVAY (211).
170. HAYNIE (T.P.), SVOBODA (A.C.), ZUIDEMA (G.D.) - Diagnosis of pancreatic disease by photoscanning.
- J. Nucl. Med., 1964, 5, 90-94, cité par KLEVAY (211).
171. HEDEGAARD (J.), FALCONE (G.), CALABRO (S.) - Incorporation of selenium into analogs of sulfur amino acids in Candida albicans.
- C.R. Soc. Biol., CLVII, 280-284, cité par SHRIFT (386).
172. HEINRICH (M.A.) - Effects of sodium selenite on several blood components.
- Toxicol. appl. Pharmacol., 1963, 5, 267-271.
173. HEINRICH (M.A.), MAC CANON (D.M.) - Some effects of sodium selenite on the cardiovascular system.
- Toxicol. appl. Pharmacol., 1960, 2, 33-43.
174. HEINRICH (M.A.), MAC CANON (D.M.) - Respiratory responses to sodium selenite.
- Toxicol. appl. Pharmacol., 1961, 3, 174-181.
175. HENSCHLER (D.), KIRCHNER (U.) - (Absorption and toxicity of selenium sulfide).
- Arch. Toxikol., 1969, 24 (4), 341-344 (All.), in C.A., 1969, 71, 37192 f.
176. HERRMAN (J.L.), Mc CONNELL (K.P.) - The binding of selenium to serum albumin. Trace elements metabolism in animals,
- 2. Proc. Int. Symp., 1974, 564-566.

177. HIDIROGLOU (M.), JENKINS (K.J.) - Fate of ^{75}Se selenomethionine in the gastrointestinal tract of sheep. Trace elements metabolism in animals, 2. Proc. Int. Symp., 1974, 574-577.
178. HIDIROGLOU (M.), JENKINS (K.), CARSON (R.B.), BROSSARD (G.A.) - Selenium and Coez Q10 levels in the tissues of dystrophic and healthy calves.
- Canad. J. Physiol. Pharmacol., 1967, 45, 568-569.
179. HIDIROGLOU (M.), JENKINS (K.J.), QUITTKAT (E.S.) - Le sort du radiosélénium administré dans le rumen ou dans la caillette du mouton.
- Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys., 1972, 12 (4), 599-616.
180. HILL (C.H.) - Reversal of selenium toxicity in chicks by mercury, copper and cadmium.
- J. Nutr., 1974, 104 (5), 593-598.
181. HIROOKA (T.), GALAMBOS (J.T.) - Selenium metabolism.
I - Respiratory excretion.
- Biochim. Biophys. Acta, 1966, 130, 313-320.
182. HOEKSTRA (W.G.) - Biochemical role of selenium. Trace elements metabolism in animals, 2. Proc. Int. Symp., 1974, 61-77.
183. HOLMBERG (R.E.), FERM (V.H.) - Interrelationships of selenium, cadmium and arsenic in mammalian teratogenesis.
- Arch. environm. Hlth, 1969, 18, 873-877.
184. HOPKINS (L.L.), POPE (A.L.), BAUMANN (C.A.) - Distribution of microgram quantities of selenium in the tissues of the rat and effects of previous selenium intake.
- J. Nutr., 1966, 88 (1), 61-65.
185. HOUCHIN -
- cité par DUMAS (J.), p. 38 (102).
186. HURD-KARRER (A.M.) - Selenium injury to wheat plants and its inhibition by sulphur.
- J. Agr. Res., 1934, 42, 343-357, cité par SHRIFT (386).
187. IGARASHI (T.), NAKAJIMA (Y.), TANAKA (M.), OHTAKE (S.) - Effect of coenzyme Q10 on experimental hypertension in rats and dogs.
- J. pharmacol. exp. Ther., 1974, 189 (1), 149-156.
188. IHNAT (M.) - Fluorometric determination of selenium in foods.
- J.A.O.A.C., 1974, 57 (2), 268-372.

189. IHNAT (M.) - Collaborative study of a fluorometric method for determining selenium in foods.
- J.A.O.A.C., 1974, 57 (2), 373-378.
190. IHNAT (M.), WESTERBY (R.J.) - Application of flameless atomization to the atomic absorption determination of selenium in biological samples.
- Analyt. Lett., 1974, 7 (4), 257-265, in C.A., 1975, 82, 13334 e.
191. IORDANOV (N.), DASKALOVA (K.), RIZOV (N.) - Gas chromatographic determination of selenium as an organoselenium compound with acetophenone.
- Talanta, 1974, 21 (11), 1217-1219.
192. IRVING (J.T.) - Curative effect of selenium upon the incisor teeth of rats deficient in vitamin E.
- Nature, 1959, 184, 645-646, cité par SONDERGAARD (396).
193. JACOBSSON (S.O.) - Uptake of Se-75 in tissues of sheep after administration of a single dose of sodium selenite Se-75, selenomethionine Se-75 or selenocystine Se-75.
- Acta vet. scand., 1966, 7 (4), 303-320.
194. JACOBSSON (S.O.), HANSSON (E.) - Distribution of selenium in mice studied by whole-body autoradiography after injection of 75-Se sodium selenite.
- Acta vet. scand., 1965, 6, 287-298.
195. JENKINS (K.J.), EWAN (L.M.), Mc CONACHIE (J.D.) - The influence of selenium on the development of nutritional encephalomalacia.
- Poult. Sci., 1965, 44, 615-617.
196. JENKINS (K.J.), HIDIROGLOU (M.), RYAN (J.F.) - Intra-vascular transport of selenium by chick serum proteins.
- Canad. J. Physiol. Pharmacol., 1969, 47, 459-467.
197. JENSEN (L.S.), WALTER (E.D.), DUNLAP (J.S.) - Influence of dietary vitamin E and selenium on distribution of 75-Se in the chick.
- Proc. exp. Soc. Biol. Med., 1963, 112 (4), 899-901.
198. JOHNSON (C.M.) - Selenium in the environment.
- Res. Rev., 1976, 62, 101-130.
199. JOHNSON (C.M.), ASHER (C.J.), BROYER (T.C.) - Distribution of selenium in plants.
- In MUTH (O.H.) (Ed.), Selenium in Biomedicine, Avi. Pub. Co., Westport, Connecticut, 1967, 57-75.

200. KAHN (H.L.), SCHALLIS (J.E.) - Improvement of detection limits for arsenic, selenium and other elements with an argon hydrogen flame.
- At. Absorption Newsletter, 1968, 7 (1), 5-9, in C.A., 1968, 69, 8068 j.
201. KAR (A.B.), DAS (R.P.), MUKERJI (B.) - Prevention of cadmium induced changes in the gonads of rat by zinc and selenium. A study in antagonism between metals in the biological system.
- Proc. nat. Inst. Sci. India, 1960, 26, B (suppl.), 40, cité par PARIZEK (303).
202. KAWAMURA (M.), MATSUMOTO (K.) -
- Jap. Analyt. (Tokyo), 1965, 14, 789, cité par SHENDRIKAR (380).
203. KAWASHIMA (T.), TANAKA (M.) - Determination of submicrogram amounts of selenium IV by means of the catalytic reduction of 1,4,6,11,-tetraazaphtacene.
- Analyt. Chim. Acta, 1968, 40 (1), 137-143.
204. KELLEHER (W.J.), JOHNSON (M.J.) - Determination of traces of selenium in organic matter. Combined spectrophotometric and isotope dilution method.
- Analyt. Chem., 1961, 33 (10), 1429-1432.
205. KERDEL-VEGAS (F.), WAGNER (F.), RUSSEL (P.B.), GRANT (N.H.), ALBURN (H.E.), CLARK (D.E.), MILLER (J.A.) - Structure of the pharmacologically active factor in the seeds of *Lecythis Ollaria*.
- Nature, 1965, 205, 1186-1187.
206. KHRAPAI (V.P.), STARTSEVA (E.A.), ZHURAVLEVA (L.E.), POPOVA (N.M.) - (Determination of impurities in pure silver by atomic absorption spectrophotometry).
- Zh. Analyt. Khim., 1974, 29 (11), 2137-2141 (Russ.), in C.A., 1975, 82, 92629 f.
207. KIKER (K.W.), BURK (R.F.) - Production of urinary selenium metabolites in the rat following $^{75}\text{-SeO}_3$ administration.
- Amer. J. Physiol., 1974, 227 (3), 643-646.
208. KING (H.G.), MORROW (R.W.) - Determination of As and Se in surface water by atomic absorption to support environmental monitoring program.
- Report, 1974, Y, 1956, 14 pages, in C.A., 1975, 83, 65245 s.
209. KIRKBRIGHT (G.F.), RANSON (L.) - Use of the nitrous oxyde acetylene flame for determination of arsenic and selenium by atomic absorption spectrometry.
- Analyt. Chem., 1971, 43 (1), 1238-1241.

210. KLEIN (A.K.) - Report on selenium.
- J. Ass. off. Agr. chem., 1943, 26, 346, cité par OSBURN (R.), the determination of selenium, Louisiana, State University, Ph. D., 1969.
211. KLEVAY (L.M.) - Pharmacology and toxicology of heavy metals : selenium.
- Pharm. ther. A, 1976, 1, 211-222.
212. KLOCHKOVSKII (S.P.), NEIMYSHEVA (L.P.) - (Kinetic determination of selenium).
- Zh. Anal. Khim., 1974, 29 (5), 929-932 (Russ.), in C.A., 1974, 81, 85570 f.
213. KNOTT (S.G.), Mc CRAY (C.W.R.) -
- Austr. vet. J., 1959, 35, 161, cité par GABBEDY (124).
214. KRAUSKOPF (K.B.) - Sedimentary deposits of rare metals.
- Econ. Geol. Fiftieth anniversary Vol., 1965, 411-463, cité par LAKIN (218).
215. KUDRYATSEV (A.P.) - (Distribution of selenium in organs and tissues of piglets).
- Veterinariya (Moscou), 1974, 11, 105-107 (Russ.), in C.A., 1975, 82, 122795 b.
216. LACASSE (Y.), RICHER (C.) - Toxicité du sélénium et de ses dérivés.
- Un. Med. Canada, 1976, 105, 1192-1199.
217. LAKIN (H.W.), BYERS (H.G.) - Selenium occurrence in certain soils in the United States with a discussion of related topics.
- Sixth report U.S. Dept. Agr. Tech. Bull., 1941, 783, cité par LAKIN (H.W.), Selenium in our environment, Trace elements in the environment, 1973, 6, 96-111.
218. LAKIN (H.W.), DAVIDSON (D.F.) - The relation of the geochemistry of selenium to its occurrence in soils.
- In MUTH (O.H.) (Ed.), Selenium in Biomedicine, Avi. Pub. Co, Westport, Connecticut, 1967, 27-56.
219. LAMAND (M.) - Lésions biochimiques dans la myopathie du veau par carence en sélénium.
- C.R. Acad. Sci. Paris, 1970, 270, 417-420.
220. LAMBERT (J.L.), ARTHUR (P.), MOORE (T.E.) - Determination of trace amounts of selenium in water.
- Analyt. Chem., 1951, 23 (8), 1101-1106.
221. LAMBERT (J.P.F.), LEVANDER (O.), ARGRET (T.L.), SIMPSON (R.E.) - Neutron activation analysis of selenium in biological samples.
- J.A.O.A.C., 1969, 52 (5), 915-917.

222. LANGMYHR (F.J.), OMANG (S.H.) - Spectrophotometric determination of selenium with 1,1' dianthrimide.
- *Analyt. Chim. Acta*, 1960, 23, 565-568, in C.A., 1961, 55, 3298 c.
223. LEE (D.J.), CHIU (M.), DRAPER (H.H.) - Effect of vitamin E deficiency on ubiquinone levels in rat and rabbit liver.
- *Nature*, 1965, 205, 288-290.
224. LEE (M.), DONG (A.), YANO (H.) - Metabolism of ⁷⁵-Se selenite by human whole blood in vitro.
- *Canad. J. Biochem.*, 1969, 47, 791-797.
225. LEGGETT (J.E.), EPSTEIN (E.) - Kinetics of sulphate absorption by barley roots.
- *Plant Physiol.*, 1956, 31, 222-226, cité par ALLAWAY (11).
226. LEIBETSEDER (J.), KMENT (A.), SKALICKY (M.) - Selenium metabolism in pigs. Trace elements metabolism in animals, 2. *Proc. Int. Symp.*, 1974, 581-583.
227. LEIFSON (E.) - New selenite enrichment media for the isolation of typhoid and paratyphoid (*Salmonella*) bacilli.
- *Amer. J. Hyg.*, 1936, 24, 423-432, cité par SHRIFT (386).
228. LEISURE (O.W.), OLSON (O.E.) - Use of the AOAC fluorometric method for selenium in plants for the analysis of papers and tobaccos.
- *J.A.O.A.C.*, 1974, 57 (3), 658-661.
229. LEONTOVITCH (N.) -
- *Chimie Analytique*, 1959, 41, 56, cité par ROQUEBERT (335).
230. LESTER (R.L.), DEMOSS (J.A.) - Effects of molybdate and selenate on formate and nitrate metabolism in *Escherichia coli*.
- *J. Bact.*, 1971, 105 (3), 1006-1014.
231. LEVAN (N.E.) - Selenium sulfide suspension in the treatment of tinea versicolor.
- *Arch. Derm.*, 1957, 75, 128-129.
232. LEVANDER (O.A.), ARGRETT (L.C.) - Effects of As, Hg, thallium and lead on selenium metabolism in rats.
- *Toxicol. appl. Pharmacol.*, 1969, 14, 308-314.
233. LEVANDER (O.A.), BAUMANN (C.A.) - Selenium metabolism. V - Studies on the distribution of selenium in rats given arsenic.
- *Toxicol. appl. Pharmacol.*, 1966, 9, 98-105.
234. LEVANDER (O.A.), BAUMANN (C.A.) - Selenium metabolism. VI - Effect of arsenic on the excretion of selenium in the bile.
- *Toxicol. appl. Pharmacol.*, 1966, 9, 106-115.

235. LEVANDER (O.A.), MORRIS (V.C.) - Interactions of methionine, vitamin E and antioxydants in selenium toxicity in the rat.
- J. Nutr., 1970, 100 (9), 1111-1118.
236. LEVINE (R.J.), OLSON (R.E.) - Blood selenium in Thai children with protein-calorie malnutrition.
- Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1970, 134 (4), 1030-1034.
237. LEWIS (B.G.), JOHNSON (C.M.), DELWICHE (C.C.) - Release of volatile selenium compounds by plants.
- J. Agr. Food Chem., 1966, 14, 638-640, cité par JOHNSON (199).
238. LEWIS (H.B.), SCHULTZ (J.), GORTNER (R.A.) - Dietary protein and the toxicity of sodium selenite in the white rat.
- J. pharmacol. exp. Ther., 1940, 68, 292-299.
239. LINDBERG (P.) - Selenium determination in plant and animal material, and in water. A methodological study.
- Acta vet. scand., 1968, suppl. 23.
240. LINDBERG (P.), SIREN (M.) - Fluorimetric selenium determinations in the liver of normal pigs affected with nutritional muscular dystrophy and liver dystrophy.
- Acta vet. scand., 1965, 6, 59-64.
241. LOPEZ (P.L.), PRESTON (R.L.), PFANDER (W.H.) - Whole-body retention, tissue distribution and excretion of Se-75 after oral and intravenous administration in lamb fed varying selenium intakes.
- J. Nutr., 1969, 97 (1), 123-132.
242. LOTT (P.F.), CUKOR (P.), MORIBER (G.), SOLGA (J.) - 2,3-diaminonaphthalene as a reagent for the determination of milligram to submicrogram amounts of selenium.
- Analyt. Chem., 1963, 35 (9), 1159-1163.
243. LOURIA (D.G.), JOSELOW (M.M.), BROSDER (A.A.) - The human toxicity of certain trace elements.
- Ann. intern. Med., 1972, 76, 307-319.
244. Mc CONNELL (K.P.) -
- Int. Conf. : Modern trends in activation analysis, College Station, Texas, Texas A & M Univ., 1961, 137-140, cité par FROST (122).
245. Mc CONNELL (K.P.), BROGHANMER (W.L.), BLOTCKY (A.J.), HURT (J.O.) - Selenium levels in human blood and tissues in health and in disease.
- J. Nutr., 1975, 105 (5), 1026-1031.

246. Mc CONNELL (K.P.), CHO (G.J.) - Transmucosal movement of selenium.
- Amer. J. Physiol., 1965, 208, 1191-1195.
247. Mc CONNELL (K.P.), CHO (G.J.) - Active transport of L-selenomethionine in the intestine.
- Amer. J. Physiol., 1967, 213, 150-156.
248. Mc CONNELL (K.P.), CHO (G.J.) - Active transport of selenium in the everted intestine of the hamster.
- In MUTH (O.H.) (Ed.), Selenium in Biomedicine, Avi. Pub. Co, Westport, Connecticut, 1967, 329-343.
249. Mc CONNELL (K.P.), PORTMAN (O.W.) - Excretion of dimethyl selenide by the rat.
- J. Biol. Chem., 1952, 195, 277-282.
250. Mc CONNELL (K.P.), ROTH (D.M.) - ⁷⁵-Se in rat intracellular liver fractions.
- Biochim. Biophys. Acta, 1966, 62, 503-508.
251. Mc CONNELL (K.P.), ROTH (D.M.) - Passage of selenium across the placenta and also into the milk of the dog.
- J. Nutr., 1964, 84 (4), 340-344.
252. Mc CONNELL (K.P.), ROTH (D.M.) - Respiratory excretion of selenium.
- Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1966, 123, 919-921.
253. Mc LEAN (J.W.), THOMSON (G.G.), CLAXTON (J.H.) - Growth response to selenium in lambs.
- Nature, 1959, 184, 251-252.
254. MAAG (D.D.), GLENN (M.W.) - Toxicity of selenium : Farm animals.
- In MUTH (O.H.) (Ed.), Selenium in Biomedicine, Avi. Pub. Co, Westport, Connecticut, 1967, 127-140.
255. MABUCHI (H.), NAKAHARA (H.) - The colorimetric determination of traces of selenium with dithizone.
- Bull. chem. Soc. Japan., 1963, 36, 151-155, in C.A., 1963, 58, 9626 a.
256. MAJAJ (A.S.) - Vitamin E responsive macrocytic anemia in protein-calorie malnutrition.
- Amer. J. Clin. Nutr., 1966, 18, 362-368.
257. MAJAJ (A.S.), DINNING (J.S.), AZZAM (S.A.), DARBY (W.J.) - Vitamin E responsive megaloblastic anemia in infants with protein-calorie malnutrition.
- Amer. J. Clin. Nutr., 1963, 12, 374-379.

258. MARKOVA (L.V.), KAPLAN (M.L.) - (Determination of micro-amounts of selenide ions by silver bromide reduction).
- Zh. Anal. Khim., 1973, 28 (5), 1018-1020 (Russ.), in C.A., 1973, 79, 73256 d.
259. MASON (K.E.), YOUNG (J.O.) - Effectiveness of selenium and zinc in protecting against cadmium induced injury of the rat testis.
- In MUTH (O.H.) (Ed.), Selenium in Biomedicine, Avi. Pub. Co, Westport, Connecticut, 1967, 383-394.
260. MASSEY (V.), WILLIAMS (C.H.) - On the reaction mechanism of yeast glutathione reductase.
- J. Biol. Chem., 1965, 240 (11), 4470-4480.
261. MATHIAS (M.M.), HOGUE (D.E.), LOOSLI (J.K.) - The biological value of selenium in bovine milk for the rat and chick.
- J. Nutr., 1967, 93 (1), 14-20.
262. MAUBILLE (A.), PIRET (L.) - Etude in vitro et in vivo de la concentration de la sélénométhionine dans une tumeur surrénalienne.
- Ann. Endocrin., 1969, 30, 324-327.
263. MAUTNER (H.G.), JAFFE (J.J.) - The activity of 6-selenopurine and related compounds against some experimental tumors.
- Cancer Res., 1958, 18, 294-298.
264. MILLAR (K.R.), SHEPPARD (A.D.), GARDINER (M.A.) - A comparison of the distribution of Se-75 in proteins of blood, liver and kidney from rats differing in selenium status.
- N.Z. J. Agr. Res., 1972, 15 (14), 756-777.
265. MILLER (J.A.), MILLER (E.C.) - Natural and synthetic chemical carcinogens in the etiology of cancer.
- Cancer Res., 1965, 25, 1292-1304.
266. MONEY (D.F.L.) - Vitamin E and selenium deficiency and their possible etiological role in the sudden death in infants syndrome.
- J. Pediat., 1970, 77 (1), 165-166.
267. MOORE (T.) - Ubiquinone and vitamin E.
- Nature, 1959, 184, 607-608.
268. MOORE (T.), SHARMAN (I.M.), SYMONDS (K.R.) - Kidney changes in vitamin E deficient rats.
- J. Nutr., 1958, 65 (2), 183-198.
269. MORETTE (A.), DIVIN (J.P.) - Sur le sélénium des eaux. Analyse - Résultats.
- Ann. pharm. franç., 1965, 23 (3), 169-178.

270. MORTON (R.A.) - Ubiquinone.
- Nature, 1958, 182, 1764-1767.
271. MOTLEY (H.L.), ELLIS (M.M.), ELLIS (M.D.) - Acute sore throats following exposure to selenium.
- J. Amer. Med. Ass., 109, 1718-1719.
272. MOXON (A.L.) - Alkali disease or selenium poisoning.
- South Dakota Agr. exp. Sta. Bull., 1937, 311, 1-91, cité par MAAG (254).
273. MOXON (A.L.), DUBOIS (K.P.) -
- J. Nutr., 1939, 18, 447, cité par HADJIMARKOS (150).
274. MOXON (A.L.), THIAN (M.) - Selenium poisoning.
- Physiol. Rev., 1943, 23, 305-337, cité par BROWNING (42).
275. MUDD (S.H.), CANTONI (G.L.) - Selenométhionine in enzymatic transmethylations.
- Nature, 1957, 180, 1052-1054.
276. MURASHOVA (V.I.), SUSHKOVA (G.S.) - (Extraction photometric method for determining small amounts of selenium with 1,1-diphenyl hydrazine).
- Zh. Anal. Khim., 1964, 19 (12), 1503-1507 (Russ.), in C.A., 1965, 63, 10675 h.
277. MUTH (O.H.), OLDFIELD (J.E.), REMMERT (L.F.), SCHUBERT (J.R.) - Effects of selenium and vitamin E on muscle disease.
- Science, 1958, 128, 1090.
278. MUTH (O.H.), PENDELL (H.W.), WATSON (C.R.), OLDFIELD (J.E.), WESWIG (P.H.) - Uptake and retention of parenterally administered ⁷⁵Se in ewes on different selenium regimes.
- Amer. J. vet. Res., 1967, 28 (126), 1397-1406, cité par WRIGHT (452).
279. NAKASHIMA (S.), TÔEI (K.) - Determination of ultra amounts of selenium by gas chromatography.
- Talanta, 1968, 15, 1475-1476.
280. NANGNIOT (P.) - (The rapid polarographic determination of selenium in plants).
- J. Electroanal. Chem., 1966, 12 (3), 187-193 (Franç.), in C.A., 1966, 65, 11341 a.
281. NELSON (A.A.), FITZHUGH (O.G.), CALUERY (H.O.) - Liver tumors following cirrhosis caused by selenium in rats.
- Cancer Res., 1943, 3, 230-236.
282. NESHEIM (M.C.), SCOTT (M.L.) - Studies on the nutritive effects of selenium for chicks.
- J. Nutr., 1958, 65 (4), 601-618.

283. NISHIDA (T.), NISHIDA (H.) - Interaction of ferrihemoglobin with peroxidized serum low density lipoprotein.
- J. Biol. Chem., 1965, 240 (1), 225-233.
284. NISSEN (P.), BENSON (A.A.) - Absence of selenate esters and selenolipid in plants.
- Biochim. Biophys. Acta, 1964, 82, 400-402.
285. NIVIERE (P.) - Utilisation du chlorhydrate du 3,3'diaminobenzidine pour le dosage colorimétrique du sélénium dans les aciers.
- Chimie Analytique, 1965, 47 (3), 125-135.
286. NOGUCHI (T.), CANTOR (A.H.), SCOTT (M.L.) - Mode of action of selenium and vitamin E in prevention of exudative diathesis in chicks.
- J. Nutr., 1973, 103 (10), 1502-1511.
287. NORTH (W.R.), BARTHAM (M.T.) - The efficiency of selenite broth of different compositions in the isolation of Salmonella.
- Appl. Microbiol., 1953, 1, 130-134, cité par SHRIFT (386).
288. OBEL (A.L.) - Studies on the morphology and etiology of so-called toxic liver dystrophy (hepatosis diaetetica) in swine.
- Acta path. microbiol. scand., 1953, suppl. 94, cité par OKSANEN (293).
289. OEHME (F.W.) - Mechanisms of heavy metal toxicities-selenium.
- Clin. toxic., 1972, 5 (2), 159-162.
290. OH (S.H.), GANTHER (H.E.), HOEKSTRA (W.G.) - Selenium as a component of glutathione peroxidase isolated from ovine erythrocytes.
- Biochemistry, 1974, 13 (9), 1825-1829.
291. OHTA (K.), SUZUKI (M.) - Determination of selenium in metallurgical samples by flameless atomic absorption spectrometry.
- Analyt. Chim. Acta, 1975, 77, 288-292, in C.A., 1975, 83, 187936 p.
292. OKSANEN (H.E.) - Studies on nutritional muscular degeneration (N.M.D.) in ruminants.
- Acta vet. scand., 1965, 6 (suppl. 2).
293. OKSANEN (H.E.) - Selenium deficiency : Clinical aspects and physiological responses in farm animals.
- In MUTH (O.H.) (Ed.), Selenium in Biomedicine, Avi. Pub. Co, Westport, Connecticut, 1967, 215-219.

294. OLDFIELD (J.E.), MUTH (O.H.), SCHUBERT (J.R.) - Selenium and vitamin E as related to growth and white muscle disease in lambs.
- Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1960, 103 (4), 799-800.
295. OLSEN (E.C.), SHELL (J.W.) - The simultaneous determination of traces of Se and Hg in organic compounds by X-ray fluorescence.
- Analyt. Chim. Acta, 1960, 23, 219-224.
296. OLSON (O.E.) - Fluorometric analysis of selenium in plants.
- J.A.O.A.C., 1969, 52 (3), 627-634.
297. ORENTREICH (N.), BERGER (R.A.) - Selenium disulfide shampoo. Its influence on hair growth on the follicular cycle.
- Arch. Derm., 1964, 90, 76-80.
298. OSTRADIUS (K.) - Toxicity of a single subcutaneous dose of sodium selenite in pigs.
- Nature, 1960, 188, 1117.
299. PALMER (D.D.) - Epilatory effect of cystaselenonine on induced hair growth in mice.
- Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1962, 128 (3), 663-666.
300. PALMER (I.S.), FISCHER (D.D.), HALVERSON (A.W.), OLSON (O.E.) - Identification of a major selenium excretory product in rat urine.
- Biochim. Biophys. Acta, 1969, 177 (2), 336-342.
301. PALMER (I.S.), GUNSALUS (R.P.), HALVERSON (A.W.), OLSON (O.E.) - Trimethyl selenonium ion as a general excretory product from selenium metabolism in the rat.
- Biochim. Biophys. Acta, 1970, 208, 260-266.
302. PARIZEK (J.), BENES (J.) - Methylated radioselenium compounds, their synthesis, metabolism and practical use.
- Radiopharmaceutical and Labelled compounds, 1973, Vol. II, 141-144.
303. PARIZEK (J.), KALOUSKOVA (J.), BABICKY (A.), BENES (J.), PAVLICK (L.) - Interaction of selenium with mercury, cadmium and other toxic metals. Trace elements metabolism in animals, 2. Proc. Int. Symp., 1974, 119-131.
304. PARIZEK (J.), OSTADALOVA (I.) - The protective effect of small amounts of selenite in sublimate intoxication.
- Experientia, 1967, 23 (2), 142-143.
305. PARKER (C.A.), HARVEY (L.G.) - Luminescence of some piaz-selenols. A new fluorimetric reagent for selenium.
- Analyst, 1962, 87, 558-565.

306. PATRIARCHE (G.J.) - Coulometric determination of selenium in urine
- *Analyt. lett.*, 1972, 5 (1), 45-50, in *C.A.*, 1972, 76, 83138 u.
307. PATTERSON (E.L.), MILSTREY (R.), STOKSTAD (E.L.R.) - Effect of selenium in preventing exudative diathesis in chicks.
- *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1957, 95 (4), 617-620.
308. PAULSON (G.D.), BAUMANN (C.A.), POPE (A.L.) - Fate of physiological dose of selenate in the lactating ewe : effect of sulfate.
- *J. Anim. Sci.*, 1966, 25, 1054-1058.
309. PAULSON (G.S.), BAUMANN (C.A.), POPE (A.L.) - Metabolism of 75-Se selenite, 75-Se selenate, 75-Se selenomethionine and 35-S-sulfate by rumen microorganisms in vitro.
- *J. Anim. Sci.*, 1968, 27 (2), 497-504.
310. PETERSON (P.J.), BUTLER (G.W.) - The uptake and assimilation of selenite by higher plants.
- *Austr. J. Biol. Sci.*, 1962, 15, 126-146, cité par ALLAWAY (11).
311. PETERSON (P.J.), BUTLER (G.W.) - Significance of selenocystathionine in an Australian selenium-accumulating plant : *Neptunia amplexicaulis*.
- *Nature*, 1967, 11, 599-600.
312. PETERSON (P.J.), BUTLER (G.W.) - The occurrence of selenocystathionine in *Morinda reticulata* Benth, a toxic seleniferous plant.
- *Austr. J. Biol. Sci.*, 1971, 24, 175-177.
313. PHY-LICH (N.) - Effects toxiques de certains oligo-éléments : le sélénium.
- *Bull. Soc. Sci. Hyg. Aliment. Ass. franç. Tech. zootech.*, 1971, 59 (2), 125-132.
314. PIERCE (F.D.), BROWN (H.R.) - Inorganic interference study of automated arsenic and selenium determination with atomic absorption spectrometry.
- *Analyt. Chem.*, 1976, 48 (4), 693-695.
315. PILLAY (K.K.S.), THOMAS (C.C.), KAMINSKI (J.W.) - Neutron activation analysis of the selenium content of fossil fuels.
- *Nuclear Appl. Technol.*, 1969, 7, 478, cité par LAKIN (H.W.), *Selenium in our environment, trace elements in the environment*, 1973, 6, 96-111.

316. PILLAY (K.K.S.), THOMAS (C.C.), SONDEL (H.A.) -
- Environm. Sci. Technol., 1971, 5, 74, cité par
SHENDRIKAR (380).
317. PINSENT (J.) - The need for selenite and molybdate in the
formation of formic deshydrogenase by members of the
coli-acrogenes group of bacteria.
- Biochem. J., 1954, 57, 10-16, cité par SHRIFT (386).
318. PLETNIKOVA (I.P.) - (Biological action and the tolerable
level of selenium entering the organism with drinking
water).
- Gig. Sanit., 1970, 35 (2), 14-19 (Russ.), in C.A.,
1970, 73, 12659 s.
319. PLOTNIKOV (V.I.) -
- Russ. J. inorg. Chem., 1964, 9, 245, cité par SHENDRIKAR
(380).
320. POOLE (C.F.), EVANS (N.J.), WIBBERLAY (D.G.) - Determination
of selenium in biological samples by gas-liquid chroma-
tography with electron capture detection.
- J. Chromatogr., 1977, 136, 73-85.
321. POTCHEN (E.J.), WILSON (R.E.), DEALY (J.B.) - External
parathyroid scanning with 75-Se selenomethionine.
- Ann. Surg., 1965, 162, 492-504.
322. POTTER (S.D.), MATRONE (G.) - Effect of selenite on the
toxicity and retention of dietary methyl mercury and
mercuric chloride.
- Fed. Proc., 1973, 32, 929.
323. PRADZYNSKI (A.H.), HENRY (R.E.), STEWART (J.L.S.) - Determi-
nation of selenium in water on the ppb level by copreci-
pitation and energy dispersive X-ray spectrometry.
- Radiochem. Radioanal., 1975, 21 (5), 277-285, in C.A.,
1975, 83, 84611 z.
324. PRINGLE (P.) - Occupational dermatitis following exposure
to inorganic selenium compounds.
- Brit. J. Derm., 1942, 54, 54-58.
325. RANN (C.S.), HAMBLY (A.N.) - The determination of selenium
by atomic absorption spectrophotometry.
- Analyt. Chim. Acta, 1965, 32 (4), 346-354.
326. RANSONE (J.W.), SCOTT (N.M.), KNOBLOCK (E.C.) - Selenium
sulfide intoxication.
- New Engl. J. Med., 1961, 264, 384-385.

327. RHEAD (W.J.), SCHRAUZER (G.N.), SALTZSTEIN (S.L.) - Sudden death in infancy and vitamin E deficiency.
- Brit. Med. J., 1973, 4, 548-549.
328. RHEAD (W.J.), SCHRAUZER (G.N.), SALTZSTEIN (S.L.), CARY (E.E.), ALLAWAY (W.H.) - Vitamin E, selenium and the sudden infant death syndrome.
- J. Pediat., 1972, 81 (2), 415-416.
329. RHIAN (M.), MOXON (A.L.) - Chronic selenium poisoning in dogs and its prevention by arsenic.
- J. pharmacol. exp. Ther., 1943, 78, 249-264.
330. RICHAUD et HAZARD -
- cités par DUMERY (103).
331. RILEY (J.F.) - Mast cells, co-carcinogenesis and anti-carcinogenesis in the skin of mice.
- Experientia, 1968, 24 (12), 1237-1238.
332. ROBERTSON (D.S.F.) - Selenium, a possible teratogen ?
- Lancet, 1970, 1, 518.
333. ROBINSON (H.M.), YAFFEE (S.N.) - Selenium sulfide treatment of pityriasis versicolor.
- J. Amer. Med. Ass., 1956, 162, 113-114.
334. ROBINSON (W.O.), WILLIAMS (K.T.), DUDLEY (H.C.), BYERS (H.G.) -
- Ind. Engl. Chem. (Anal Ed.), 1934, 6, 274, cité par ROQUEBERT (335).
335. ROQUEBERT (J.P.) - Le sélénium : aperçu analytique, hydrologique, pharmacodynamique.
- Thèse Pharm., Univ. Bordeaux, 1962, N° 1.
336. ROQUEBERT (J.P.), TRUHAUT (R.) - Dosage colorimétrique du sélénium dans les milieux biologiques.
- Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1962, 101 (3), 143-146.
337. ROQUEBERT (J.P.), VITTE (G.) - Etude de la fixation et de l'élimination du sélénium au cours d'intoxication chez le lapin.
- Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1962, 101, 237-242.
338. ROSENFELD (I.) - Biosynthesis of seleno-compounds from inorganic selenium by sheep.
- Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1962, 111 (3), 670-673.
339. ROSENFELD (I.), BEATH (O.A.) - The elimination and distribution of selenium in the tissue in experimental selenium poisoning.
- J. Nutr., 1945, 30 (6), 443-449.

340. ROSENFELD (I.), BEATH (O.A.) - Selenium.
- Academic. New York, 1964, cité par HARR (164).
341. ROSENHEIM et TUNNICLIFFE -
- 1901, cités par BROWNING (42).
342. ROSENTHAL (J.W.), ADLER (H.) - Effect of selenium disulfide on rabbit eyes.
- South Med. J. Austr., 1962, 55 (3), 318, in C.N.R.S., 1962, 23, 13, 10888.
343. ROTRUCK (J.T.), POPE (A.L.), GANTHER (H.E.), HOEKSTRA (W.G.) - Prevention of oxidative damage to rat erythrocytes by dietary selenium.
- J. Nutr., 1972, 102 (5), 689-696.
344. ROTRUCK (J.T.), POPE (A.L.), GANTHER (H.E.), SWANSON (A.B.), HAFEMAN (D.G.), HOEKSTRA (W.G.) - Selenium : biochemical role as a component of glutathione peroxidase.
- Science, 1973, 179, 588-590.
345. ROUBAL (W.T.), TAPPEL (A.L.) - Damage to proteins, enzymes and amino acids by peroxidizing lipids.
- Arch. Biochem. Biophys., 1966, 113, 5-8.
346. ROUBAL (W.T.), TAPPEL (A.L.) - Polymerization of free-radical induced lipid peroxidation.
- Arch. Biochem. Biophys., 1966, 113, 150-155.
347. SANDHOLM (M.) - The initial fate of a trace amount of intravenously administered selenite.
- Acta pharmacol. toxic., 1973, 33 (1), 1-5.
348. SANDHOLM (M.) - The metabolism of selenite in cow blood in vitro.
- Acta pharmacol. toxic., 1973, 33, 6-16.
349. SANDHOLM (M.) - Function of erythrocytes in attaching Se-75 labeled selenite onto specific plasma proteins.
- Acta pharmacol. toxic., 1975, 36 (4), 321-327.
350. SAMUEL (N.), Mc SHARRY (W.) - Atomic absorption spectrophotometric determination of selenium in animal feed premix using the vapor generation technique.
- J.A.O.A.C., 1975, 58 (5), 987-989.
351. SCALA (J.), WILLIAMS (H.H.) - The enhancement of selenite toxicity by methionine in Escherichia coli.
- Arch. Biochem. Biophys., 1962, 99, 363-368.
352. SCALA (J.), WILLIAMS (H.H.) - A comparison of selenite and tellurite toxicity in Escherichia coli.
- Arch. Biochem. Biophys., 1963, 101, 319-324.

353. SCALA (J.), ULRICH (P.), WILLIAMS (H.H.) - The effects of selenite on beta-galactosidase induction in *Escherichia coli*.
- Arch. Biochem. Biophys., 1964, 107, 132-136.
354. SCHMIDT (F.J.), ROYER (J.L.) - Submicrogram determination of arsenic, selenium, antimony and bismuth by atomic absorption utilizing sodium borohydride reduction.
- Analyt. Lett., 1973, 6 (1), 17-23, in C.A., 1973, 78, 92121 b.
355. SCHREINER (O.), SULLIVAN (M.X.) - Studies in soil oxidation.
- U.S. Bureau of soils, 1910, Bull. 73, cité par ALLAWAY (11).
356. SCHROEDER (H.A.), MITCHENER (M.) - Selenium and tellurium in rats : effect on growth, survival and tumors.
- J. Nutr., 1971, 101 (11), 1531-1540.
357. SCHROEDER (H.A.), MITCHENER (M.) - Selenium and tellurium in mice : effects on growth, survival and tumors.
- Arch. environm. Hlth, 1972, 24 (1), 66-71.
358. SCHUTZ (D.F.), TUREKIAN (K.K.) - The investigation of the geographical and vertical distribution of several trace elements in sea water using neutron activation analysis.
- Geochim. Cosmochim. Acta, 1965, 29, 259-313, cité par LAKIN (218).
359. SCHWARZ (K.) - (Tocopherol as a liver protecting agent).
- Z. Physiol. Chem., 1944, 281, 109-116 (All.), cité par SONDERGAARD (396).
360. SCHWARZ (K.) - Production of dietary necrotic liver degeneration using american torula yeast.
- Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1951, 77 (4), 818-823.
361. SCHWARZ (K.) - A hitherto unrecognized factor against dietary necrotic liver degeneration in american yeast (factor 3).
- Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1951, 78, 852-856.
362. SCHWARZ (K.) - Vitamin E, trace elements and sulphydryl groups in respiratory decline.
- Vitamins and Hormones, 1962, 20, 463-484, cité par MILLAR (125).
363. SCHWARZ (K.), BIERI (J.G.), BRIGGS (G.M.), SCOTT (M.L.) - Prevention of exudative diathesis in chicks by factor 3 and selenium.
- Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1957, 95 (4), 621-625.

364. SCHWARZ (K.), FOLTZ (C.M.) - Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration.
- J. Amer. Chem. Soc., 1957, 79, 3292-3293.
365. SCHWARZ (K.), MERTZ (W.), SIMON (E.J.) - In vitro effect of tocopherol metabolites on respiratory decline in dietary necrotic liver degeneration.
- Biochim. Biophys. Acta, 1959, 32, 484-491.
366. SCOTT (M.L.) - Selenium deficiency in chicks and poults.
- In MUTH (O.H.) (Ed.), Selenium in Biomedicine, Avi. Pub. Co, Westport, Connecticut, 1967, 231-238.
367. SCOTT (M.L.), HILL (F.W.), NORRIS (L.C.), DOBSON (D.C.), NELSON (T.S.) - Studies on vitamin E in poultry nutrition.
- J. Nutr., 1955, 56 (3), 387-402.
368. SCOTT (M.L.), NOGUCHI (T.) - Metabolic function of selenium in prevention of exudative diathesis in chicks.
- Fed. Proc., 1973, 32, 885.
369. SCOTT (R.C.), VOEGELI (P.T.) - Radiochemical analyses of ground and surface water in Colorado, 1954-1961.
- Colorado water conservation board basic data Report, 1961, N° 7, cité par LAKIN (218).
370. SEWARD (C.R.), VAUGHAN (G.), HOVE (E.L.) - Effect of selenium on incisor depigmentation and carbon tetrachloride poisoning in vitamin E deficient rats.
- Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1966, 121 (3), 850-852.
371. SHAMBERGER (R.J.) -
- Lancet, 1971, 2, 7137, cité par RHEAD (328).
372. SHAMBERGER (R.J.) - Is selenium a teratogen ?
- Lancet, 1971, 2, 1316.
373. SHAMBERGER (R.J.) - Antioxydants and cancer. III - Selenium and other antioxydants decrease carcinogen-induced chromosome breakage. Trace elements metabolism in animals, 2. Proc. Int. Symp., 1974, 593-597.
374. SHAMBERGER (R.J.), FROST (D.V.) - Possible protective effect of selenium against human cancer.
- Canad. Med. Ass. J., 1969, 100, 682, in I.A.R.C. monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemical to man, 1975, 2, 246-260.
375. SHAMBERGER (R.J.), RUDOLPH (G.) - Protection against carcinogenesis by antioxydants.
- Experientia, 1966, 22 (2), 116.

376. SHAVER (R.C.), Mc CROSKY (C.R.) -
- Ind. Engl. Chem. (Anal Ed.), 1940, 12, 74, cité par ROQUEBERT (335).
377. SHAWKY (M.), WHITE (C.L.) - Fluorometric determination of submicrogram concentrations of selenium in sulfide samples.
- Analyt. Chem., 1976, 48 (11), 1484-1486.
378. SHEARER (T.R.) - Changes in eating and drinking behaviour of rats caused by selenium. Trace elements metabolism in animals, 2. Proc. Int. Symp., 1974, 590-592.
379. SHEARER (T.R.), HADJIMARKOS (D.M.) - Comparative distribution of ⁷⁵-Se in the hard and soft tissues of mother rats and their pups.
- J. Nutr., 1973, 103 (4), 553-559
380. SHENDRIKAR (A.D.) - Critical evaluation of analytical methods for the determination of selenium in air, water and biological materials.
- The Science of the total environment, 1974, 3, 155-156.
381. SHENDRIKAR (A.D.), WEST (P.W.) - Determination of selenium in the smoke from trash burning.
- Environm. Lett., 1973, 5 (1), 29-35, in C.A., 1973, 79 82983 r.
382. SHIGEKI (O.), SEIICHI (U.) - Gravimetric determination of selenium from perchloric acid solution with hydrazine.
- Talanta, 1975, 22 (1), 51-55, in C.A., 1975, 83, 21611 d.
383. SHIMAZU (F.), TAPPEL (A.L.) - Seleno-amino acids : decrease of radiation damage to amino-acids and proteins.
- Science, 1964, 143, 369-370.
384. SHIMOISHI (Y.) - The gas chromatographic determination of selenium (IV) and total selenium in milk, milk products and albumin with 1,2-diamino-4-nitrobenzene.
- Analyst, 1976, 101, 298-305.
385. SHRENG (W.T.), BROWNING (B.L.) -
- J. Amer. Chem. Soc., 1926, 48, 2550, cité par ROQUEBERT (335).
386. SHRIFT (A.) - Microbial research with selenium.
- In MUTH (O.H.) (Ed.), Selenium in Biomedicine, Avi. Pub. Co, Westport, Connecticut, 1967, 241-271.

387. SHRIFT (A.), VIRUPAKSHA (T.K.) - Biosynthesis of Se-methyl-selenocysteine from selenite in selenium accumulating plants.
- Biochim. Biophys. Acta, 1963, 71, 483-485.
388. SHRIFT (A.), VIRUPAKSHA (T.K.) - Seleno-amino-acids in selenium accumulating plants.
- Biochim. Biophys. Acta, 1965, 100, 65-75.
389. SHUM (A.C.), MURPHY (J.C.) - Effects of selenium compounds on formate metabolism and coincidence of selenium-75 incorporation and formic deshydrogenase activity in cell-free preparations of Escherichia coli.
- J. Bact., 1972, 110 (1), 430-438.
390. SIEMER (D.D.), PRABHAKARAN (K.) - Comparisons of methods of hydride generation atomic absorption spectrometry arsenic and selenium determination.
- Analyt. Chem., 1977, 49 (8), 1096-1099.
391. SIVJAKOV (K.I.), BRAUN (H.A.) - The treatment of acute selenium, cadmium and tungsten intoxication in rats with calcium disodium ethylene diamine tetraacetate.
- Toxicol appl. Pharmacol., 1959, 1, 602-608.
392. SKUPIN (J.) - A comparison of chemically and enzymically prepared Se-adenosylselenomethionine.
- Biochim. Pol., 1962, IX, 253-259, in C.A., 1962, 57, 15463 b.
393. SLEPYAN (A.H.) -
- Arch. Derm. Syph., 1952, 65, 228-229, cité par POLSON (C.J.), TATTERSALL (R.N.), Clinical toxicology, 2nd Ed., Lippincott, Philadelphia, 1969, 326-329.
394. SMITH (M.I.), WESTFALL (B.B.) -
- Publ. Hlth Rep., Washington, 1937, 52, 1375, cité par PHU-LICH (313).
395. SMITH (P.J.), TAPPEL (A.L.), CHOW (C.K.) - Glutathione peroxidase activity as a function of dietary selenomethionine.
- Nature, 1974, 247, 392-393.
396. SONDERGAARD (E.) - Selenium and vitamin E interrelationships.
- In MUTH (O.H.) (Ed.), Selenium in Biomedicine, Avi. Pub. Co, Westport, Connecticut, 1967, 365-381.
397. SPACU -
- Bull. Soc. Chim., 1936, 3, 159, cité par ROQUEBERT (335).
398. SPALLHOLZ (J.E.), MARTIN (J.L.), GERLACH (M.L.), HEINZERLING (R.H.) - Immunologic responses of mice fed diets supplemented with selenite selenium.
- Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1973, 143 (3), 685-689.

399. SPALLHOLZ (J.E.), MARTIN (J.L.), GERLACH (M.L.), HEINZERLING (R.H.) - Effect of selenicals on the primary immune response in mice. Trace elements metabolism in animals, 2. Proc. Int. Symp., 1974, 567-570.
400. SPENCER (R.P.), BLAU (M.) - Intestinal transport of selenium-75 selenomethionine.
- Science, 1962, 136, 155-156.
401. STADTMAN (T.C.) - Selenium in biochemistry.
- Science, 1974, 183, 915-922.
402. STAHL (A.R.) - Preliminary air pollution survey of selenium and its compounds.
- U.S. Department of Health Education and Welfare, N.A.P. C.A., 1969, cité par SHENDRIKAR (380).
403. STANCHEV (P.) - (Bismuthiol as a reagent for the photometric determination of selenium).
- Z. Anal. Chem., 1966, 220 (1), 33-37 (Russ.), in C.A., 1966, 65, 11340 g.
404. STANLEY (T.O.), TAPPEL (A.L.) - Effect of dietary selenium on glutathione peroxidase in the chick.
- J. Nutr., 1974, 104 (6), 747-753.
405. STERNER (J.H.), LIDFELT (V.) -
- J. pharmacol. exp. Ther., 1941, 73, 205, cité par GLOVER (134).
406. STIJVE (T.), CARDINALE (E.) - Rapid determination of selenium in various substrates by electron capture gas liquid chromatography.
- J. Chromatogr., 1975, 109, 239-245.
407. SVIRBELEY (J.L.) -
- Biochem. J., 1938, 32, 467, cité par LACASSE (216).
408. TABOR (E.C.), BRAVERMAN (M.M.), BUMSTEAD (H.E.), CAROTT (A.), DONALDSON (H.M.), DUBOIS (H.M.), KUPEL (R.E.) - Tentative method of analysis for selenium content of atmospheric particulate matter.
- Health Lab. Sci., 1970, 7 (1), 96-101.
409. TABOURY (M.F.) - Toxicologie du sélénium et de ses composés chez les animaux et les végétaux.
- Bull. Soc. Chim. Biol., 1945, 27, 157-163.
410. TANK (G.), STORVICK (C.A.) -
- J. Dent. Res., 1960, 39, 473, cité par GLOVER (134).
411. TAPPEL (A.L.) - Free radical lipid peroxidation damage and its inhibition by vitamin E and selenium.
- Fed. Proc., 1965, 24, 73-78.

412. TAPPEL (A.L.), CALDWELL (K.A.) - Redox properties of selenium compounds related to biochemical function.
- In MUTH (O.H.) (Ed.), Selenium in Biomedicine, Avi. Pub. Co, Westport, Connecticut, 1967, 345-361.
413. TAUSKY (H.H.), WASHINGTON (A.), ZUBILLAGA (E.), MILHORAT (A.T.) - Determination of trace selenium in biological fluids and tissues.
- Microchem. J., 1966, 10, 470-484.
414. THOMAS (C.G.), PEPPER (F.D.), OWEN (J.) - Differentiation of malignant from benign lesions of the thyroid gland using complementary scanning with ⁷⁵Se selenomethionine and radioiodide.
- Ann. Surg., 1969, 170, 396-408.
415. THOMPSON (J.N.), SCOTT (M.L.) - Role of selenium in the nutrition of the chick.
- J. Nutr., 1969, 97 (3), 335-342.
416. TINSLEY (I.J.), HARR (J.R.), BONE (J.F.), WESWIG (P.H.), YAMAMOTO (R.S.) - Selenium toxicity in rats. I - Growth and longevity.
- In MUTH (O.H.) (Ed.), Selenium in Biomedicine, Avi. Pub. Co, Westport, Connecticut, 1967, 141-152.
417. TINTHOIN (J.F.) - Traitement radical du pityriasis versicolor par le sulfure de sélénium.
- Bull. Soc. franç. Derm. Syph., 1967, 74 (6), 783-785.
418. TOOLE (J.F.), WITCOFSKI (R.) - Selenomethionine ⁷⁵Se scan for thymoma.
- J. amer. med. Ass., 1966, 198, 1219-1220.
419. TRAPP (J.A.), MILLAN (J.) - Distribution of Se-75 in brains of selenium deficient rats.
- J. Neurochem., 1975, 24 (3), 593-595.
420. TRELEASE (S.F.), BEATH (O.A.) - Selenium.
- Publié par les auteurs, New York, 1949, cité par JOHNSON (199).
421. TRELEASE (S.F.), GREENFIELD (S.S.) - Influence of plant extracts proteins, and amino-acids on the accumulation of selenium in plants.
- Amer. J. Botany, 1944, 31, 630-638, cité par JOHNSON (199).
422. TUVE (T.), WILLIAMS (H.H.) - Metabolism of selenium by Escherichia coli : biosynthesis of selenomethionine.
- J. Biol. Chem., 1961, 236, 597-601.

423. ULLREY (D.E.) - The selenium deficiency problem in animal agriculture. Trace elements metabolism in animals, 2. Proc. Int. Symp., 1974, 275-293.
424. ULRICH (J.M.), SHRIFT (A.) - Absorption of selenate and selenite by Astragalus roots.
- Abstracts Amer. Soc. Plant Phys. Western Section Meeting, Seattle, Washington, 1966, cité par ALLAWAY (11).
425. VERIMONT (G.), HOPKINSON (F.J.).
- Ind. Engl. Chem. (Anal Ed.), 1940, 12, 307, cité par ROQUEBERT (335).
426. VILLALON (J.A.M.) - Primer estudio hecho en Mexico de la union de alfa-tocoferol y selenio (TOLSEM) en el tratamiento de cardioangioesclerosis.
- 1974, cité par FROST (122).
427. VINOGRADOV (A.P.) - The geochemistry of rare and dispersed chemical elements in soils.
- 2nd Edition, Consultants Bureau Inc., New York, 1959, cité par LAKIN (218).
428. VIRUPAKSHA (T.K.), SHRIFT (A.) - Biochemical differences between selenium accumulator and non-accumulator Astragalus species.
- Biochim. Biophys. Acta, 1965, 107, 69-80.
429. VOHRA (P.), JOHNSON (C.M.), Mc FARLAND (L.Z.), SIOPEs (T.D.), WILSON (W.O.), WINGET (C.M.) - Role of selenium in neural physiology of avian species. 2 - The distribution of 75-Se from injected selenomethionine 75-Se in the tissues and its fate in livers of chickens.
- Poult. Sci., 1973, 52, 644-647.
430. VOLGAREV (M.N.), TSCHERKES (L.A.) - Further studies in tissue changes associated with sodium selenate.
- In MUTH (O.H.) (Ed.), Selenium in Biomedicine, Avi. Pub. Co, Westport, Connecticut, 1967, 179-184.
431. WALKER (H.H.), RUNNELS (J.H.), MERRYFIELD (R.) - Determination of traces quantities of selenium in petroleum and petroleum products by atomic absorption spectrometry.
- Analyt. Chem., 1976, 48 (14), 2056-2060.
432. WARING (C.L.), WORTHING (H.W.), HAZEL (V.H.) - Spectrochemical method for the determination of selenium.
- Analyt. Chem., 1958, 30 (9), 1504-1506.
433. WATERLOW (J.), MONTGOMERY (R.) -
- cités par HOPKINS (L.L.), MAJAJ (A.S.), in MUTH (O.H.) (Ed.), Selenium in Biomedicine, Avi. Pub. Co, Westport, Connecticut, 1967, 203-214.

434. WATKINSON (J.H.) - Fluorometric determination of traces of selenium.
- *Analyt. Chem.*, 1960, 32 (8), 981-983.
435. WATKINSON (J.H.) - A selenium accumulating plant of the humid regions : *Amanita muscaria*.
- *Nature*, 1964, 202, 1239-1240.
436. WATKINSON (J.H.) - Fluorometric determination of selenium in biological material with 2,3-diamino-naphtalene.
- *Analyt. Chem.*, 1966, 38 (1), 92-97.
437. WATKINSON (J.H.) - Analytical methods for selenium in biological materials.
- In MUTH (O.H.) (Ed.), *Selenium in Biomedicine*, Avi. Pub. Co, Westport, Connecticut, 1967, 97-117.
438. WEISBERGER (A.S.), SUHRLAND (L.G.) -
- *Blood*, 1956, 11, in *Selenium and Cancer*, *Nutr. Rev.*, 1970, 28 (3), 75-80.
439. WEISS (K.F.), AYRES (J.C.), KRAFT (A.A.) - Inhibitory action of selenite on *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* and *Salmonella Thompson*.
- *J. Bact.*, 1965, 90 (4), 857-862.
440. WEISSMAN (G.S.), TRELEASE (S.F.) - Influence of sulfur on the toxicity of selenium to *Aspergillus*.
- *Amer. J. Botany.*, 1955, 42, 489-495, cité par SHRIFT (386).
441. WELCHER (G.G.), KRIEGE (O.H.), MARKS (J.J.) - Direct determination of trace quantities of lead, tin, selenium, tellurium and thallium in high temperature alloys by non flame atomic absorption spectrophotometry.
- *Analyt. Chem.*, 1974, 46 (9), 1227-1231.
442. WEST (P.W.), CIMERMAN (C.) - Microdetermination of selenium with 3,3'-diamino-benzidine by the ring over technique and its application to air pollution studies.
- *Analyt. Chem.*, 1964, 36 (10), 2013-2016.
443. WEST (P.W.), RAMAKRISHNA (T.V.) - A catalytic method for determining traces of selenium.
- *Analyt. Chem.*, 1968, 40 (6), 966-968.
444. WESTFALL (B.B.), STOHLMAN (E.F.), SMITH (M.I.) - Placental transmission of selenium.
- *J. pharmacol. exp. Ther.*, 1938, 64, 55-57, cité par WRIGHT (452).
445. WHEELER (G.L.), LOTT (P.F.) - Rapid determination of trace amounts of selenium IV, nitrite and nitrate by high pressure liquid chromatography using 2,3-diamino-naphtalene.
- *Microchem. J.*, 1974, 19 (4), 390-405, in *C.A.*, 1975, 82, 67761 k.

446. WIDSTROM (V.R.) - Effect of selenate ions on the growth of *Neurospora crassa* in the presence of various sulfur sources.
- Proc. South Dakota Acad. Sci., 1961, XL, 208-212, cité par SHRIFT (386).
447. WILLIAMS (K.T.), BYERS (H.G.) - Selenium compounds in soils.
- Ind. Engl. Chem., 1936, 28, 912-914, cité par LAKIN (218).
448. WILLIAMS (K.T.), LAKIN (H.W.), BYERS (H.G.) -
- Tech. Bull., 1941, N° 758, 1-69, U.S. Department of Agriculture, cité par GLOVER (134).
449. WILSON (L.G.), BANDURSKI (R.S.) - Enzymatic reactions involving sulfate, sulfite, selenate and molybdate.
- J. Biol. Chem., 1958, 233, 975-981.
450. WRIGHT (E.) - The distribution and excretion of radio-selenium in sheep.
- N. Z. J. Agr. Res., 1965, 8 (2), 284-291, in C.A., 1965, 63, 3418 e.
451. WRIGHT (E.) - The distribution and excretion of radio-selenium by the tissues of selenium-responsive sheep in relation to their growth rates.
- N. Z. J. Agr. Res., 1965, 8 (2), 292-294, in C.A., 1965, 63, 3418 f.
452. WRIGHT (P.L.) - The absorption and tissue distribution of selenium in depleted animals.
- In MUTH (O.H.) (Ed.), Selenium in Biomedicine, Avi. Pub. Co, Westport, Connecticut, 1967, 313-328.
453. WRIGHT (P.L.), BELL (M.C.) - Selenium and vitamin E influence upon the in vitro uptake of Se-75 by ovine blood cells.
- Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1963, 114, 379-382.
454. WRIGHT (P.L.), BELL (M.C.) - Selenium-75 metabolism in the gestating ewe and fetal lamb : effect of dietary alpha-tocopherol and selenium.
- J. Nutr., 1964, 84 (1), 49-57.
455. WRIGHT (P.L.), BELL (M.C.) - Comparative metabolism of selenium and tellurium in sheep and swine.
- Amer. J. Physiol., 1966, 211, 6-10.
456. WRIGHT (P.L.), MRAZ (F.R.) - Influence of dietary selenium and age upon the metabolism of 75-Se by chicks.
- Poult. Sci., 1964, 43 (4), 947-954.

457. YAJIMA (S.), KAMEMOTO (Y.), SHIBA (K.), ONODA (Y.) - The determination of impurities in tellurium and selenium by activation analysis.
- J. Chem. Soc. Japan. (Pure Chem. Sect.), 1961, 82, 343-347, in C.A., 1961, 55, 16268 g.
458. YAMAMOTO (Y.), KAMAMARU (T.), HAYASHI (Y.), KANKE (M.) - Enhancement of sensitivity for selenium determination in atomic absorption spectrophotometry by introducing hydrogen selenide into an argon-hydrogen flame.
- Analyt. Lett., 1972, 5 (10), 717-721.
459. YOUNG (J.W.), CHRISTIAN (G.D.) - Gas chromatographic determination of selenium.
- Analyt. Chim. Acta, 1973, 65 (1), 127-138.
-

